

MIKROKALORIMETRISCHE
UNTERSUCHUNGEN

an Hefekulturen

und

Beiträge zur theoretischen Deutung

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingolf Lamprecht
aus Dortmund

1969

MIKROKALORIMETRISCHE
UNTERSUCHUNGEN

an Hefekulturen

und

Beiträge zur theoretischen Deutung



INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingolf Lamprecht
aus Dortmund



1. Referent: Prof. Dr. W. Stein

2. Referent: Prof. Dr. W. Pohlit

Tag der mündlichen Prüfung: 4.7.1969

Tag der Promotion:

29. SEP. 1969

MEINEM VATER

IN GROSSER DANKBARKEIT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
1.1 <u>Die Bedeutung der Thermodynamik für die Untersuchung cellulärer Prozesse</u>	1
1.2 <u>Größe der zu erwartenden Effekte und Auswahl eines geeigneten Kalorimeters</u>	4
<u>2. KALORIMETRIE</u>	7
2.1 <u>Bauformen von Kalorimetern</u>	7
2.1.1 <u>Messung einer Temperaturerhöhung</u>	7
2.1.2 <u>Messung eines Wärmeflusses</u>	8
2.2 <u>Mikrokalorimeter</u>	8
2.2.1 <u>Allgemeines über Mikrokalorimeter</u>	8
2.2.2 <u>Das Mikrokalorimeter E. Calvet</u>	9
<u>3. BIOLOGISCHE KALORIMETRIE</u>	12
3.1 <u>Allgemeine Entwicklung der biologischen Kalorimetrie</u>	12
3.2 <u>Messungen mit dem Mikrokalorimeter E. Calvet</u>	14
<u>4. DAS MIKROKALORIMETER E. CALVET UND AUF- GABENSTELLUNG</u>	15
4.1 <u>Entwicklung und Prinzip des Mikrokalorimeters E. Calvet</u>	15
4.2 <u>Das kommerzielle Gerät</u>	16
4.3 <u>Möglichkeiten des Gerätes</u>	19
4.4 <u>Aufgabenstellung</u>	19

5.	APPARATIVER AUFBAU	20
5.1	<u>Einrichtung des Meßraumes</u>	20
5.2	<u>Klimagerät</u>	22
5.3	<u>Galvanometer</u>	23
5.4	<u>Aufstellung der Galvanometer</u>	25
5.5	<u>Lichtpunktfolgeschreiber</u>	26
5.6	<u>Integratoren</u>	27
5.7	<u>Temperatursteuergerät R.T. 64</u>	27
5.8	<u>Kalorimereinsätze</u>	28
5.9	<u>Belüftung der Kammern</u>	30
5.10	<u>Bestrahlungsanlagen</u>	30
6.	BIOLOGISCHES MATERIAL	31
6.1	<u>Stämme</u>	31
6.2	<u>Vorkulturbedingungen</u>	32
6.3	<u>Form der Beimpfung</u>	33
6.4	<u>Medien</u>	33
6.4.1	<u>Minimalmedium</u>	33
6.4.2	<u>Vollmedium</u>	34
6.4.3	<u>Variiertes Vollmedium</u>	34
6.4.4	<u>Agarmedium</u>	34
6.4.5	<u>Glucose-Puffer</u>	34
7.	VERSUCHSABLAUF UND ERGEBNISSE	34
7.1	<u>Kurze Zusammenfassung des Versuchsablaufes</u>	34
7.2	<u>Eichung der Apparatur</u>	35
7.3	<u>Rühren und Belüften des Mediums</u>	37

7.4	<u>Energieabgabe und Glucoseverbrauch</u>	38
7.5	<u>Abhängigkeit der maximalen Wärmeabgabe vom Zelltiter</u>	40
7.6	<u>Wärmeentwicklung und Zunahme der Zellzahl</u>	40
7.7	<u>Wachstumswärme als Funktion der Glucose-Konzentration des Mediums</u>	43
7.8	<u>Übergang von Minimal- zu Vollmedium</u>	49
7.9	<u>Energieabgabe beim Wachstum auf einem Agarmedium</u>	51
7.10	<u>Betriebsstoffwechsel</u>	54
7.11	<u>Wärmeentwicklung bei Wachstum nach UV- und Röntgenbestrahlung</u>	57
7.12	<u>Betriebsstoffwechsel nach Bestrahlung</u>	61
7.13	<u>Temperaturabhängigkeit der Wärmezeugung und des Wachstums</u>	62
7.13.1	Messungen mit dem Kalorimeter	62
7.13.2	Ermittlung durch Trübungsmessung	65
7.13.3	Messung des Betriebsstoffwechsels	66
8.	<u>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</u>	67
8.1	<u>Form der Thermogramme</u>	67
8.2	<u>Endtiter beim Wachstum</u>	70
8.3	<u>Wärmeabgabe und Wirkungsgrad</u>	72
8.4	<u>Energieabgabe pro Einzelzelle</u>	78
8.5	<u>Geschwindigkeitskonstanten</u>	80
8.6	<u>Ermittlung der Aktivierungsgrößen</u>	84
9.	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	87

ANHANG

<u>A 1</u>	<u>Die logistische Funktion</u>	90
<u>A 2</u>	<u>Reaktionskinetische Gleichung</u>	95
<u>A 3</u>	<u>Abschätzung der Verdunstungswärme</u>	97
<u>A 4</u>	<u>Die Bedeutung des Zellwassers</u>	98
<u>A 5</u>	<u>Abschätzung des Entropiegehaltes von Hefezellen</u>	101
A 5.1.1	<u>aus der Wachstumswärme</u>	101
A 5.1.2	<u>aus der Verbrennungswärme</u>	101
A 5.1.3	<u>aus Standardentropie und Wachstumswärme</u>	102
A 5.2.1	<u>über die Photosynthese</u>	104
A 5.2.2	<u>auf statistischem Wege</u>	104
A 5.2.3	<u>als Strukturentropie</u>	106
A 5.3	<u>Diskussion der Berechnungen</u>	108
<u>A 6</u>	<u>Abschätzung des Informationsgehaltes von Hefezellen</u>	110
	Literaturverzeichnis	113

1. EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung der Thermodynamik für die Untersuchung cellularer Prozesse

"The proper study of biology should start from thermodynamic principles. In fact, energy and its transformations may be viewed as the central theme which can best systematize biological facts and theory. Thermodynamic principles thus become the most fundamental way of analyzing all biological processes, just as they have long been accepted and used as the most fundamental approach to analysis of chemical and physical processes." (LEHNINGER 1965)

Wenn auch heute die Anwendbarkeit der Thermodynamik auf biologische Vorgänge außer Frage steht, so ist es doch notwendig zu begründen, warum für bestimmte Probleme die Mikrokalorimetrie das geeignetste Untersuchungsmittel darstellt.

In den letzten Jahren und Jahrzehnten ist nämlich eine Fülle neuer Methoden zur Gewinnung biologischer Daten entwickelt worden. Sie reichen von Elektrophorese und Gradientenzentrifugation über Beobachtungsmöglichkeiten mit hochauflösenden optischen und Elektronenmikroskopen, mit Spektrographen verschiedener Wellenlängenbereiche und mit Röntgenbeugung bis zur Isotopenanalyse und zu jenen Techniken, die durch die moderne Elektronik möglich geworden sind: Elektronen- und Kernspinresonanz sowie Massenspektroskopie.

Diese mehr der Strukturaufklärung dienenden Verfahren werden durch Impulsmethoden und Kurzzeitmessungen zur Ermittlung der Kinetik biochemischer Reaktionen ergänzt.

Im Gegensatz zu den erwähnten Methoden kann die Thermodynamik über Struktur und Kinetik keine detaillierten Aussagen, sondern stets nur Bruttoergebnisse liefern, die in geeigneter Weise, z.T. unter Heranziehung weiterer Verfahren, interpretiert werden müssen. Sie gibt aber die Möglichkeit, auf anderem Wege gewonnene Modellvorstellungen auf ihre Gültigkeit zu überprüfen.

Alle Prozesse in der Zelle, ob sie nun dem individuellen Wachstum (Baustoffwechsel), der Aufrechterhaltung einer bestimmten Struktur (Betriebsstoffwechsel) oder der

Vermehrung dienen, sind mit einem Energieumsatz verbunden. Diese thermischen Umwandlungen werden im Bruttoergebnis durch die Änderung der Zustandsgrößen U (innere Energie), S (Entropie), H (Enthalpie) und G (Freie Enthalpie) beschrieben, die eindeutige thermodynamische Parameter darstellen.

Allerdings ist die Übertragung der klassischen Thermodynamik auf die Biologie nicht selbstverständlich. Lebende Organismen sind offene Systeme, die mit ihrer Umgebung im Materie- und Energieaustausch stehen, während sich die klassische Thermodynamik mit abgeschlossenen Systemen befaßt, ja ihre Hauptsätze nur mit der ausdrücklichen Beschränkung auf Bereiche ausspricht, die gegenüber ihrer Umwelt vollständig isoliert sind.

Ein Widerspruch zwischen der Aussage des II. Hauptsatzes der Thermodynamik, daß bei einem freiwillig ablaufenden Prozeß die Entropie nur zunehmen kann, und der Beobachtung des Wachstums organischer Strukturen, d.h. der deutlichen Abnahme der Entropie, besteht allerdings nur scheinbar. Denn es darf nicht übersehen werden, daß der II. Hauptsatz die Entwicklung der Gesamtentropie eines abgeschlossenen Systems vorhersagt, während er für offene Systeme oder Teile von abgeschlossenen Systemen in seiner ursprünglichen Bedeutung nicht anwendbar ist.¹⁾

Wenn in einem abgeschlossenen System die Tendenz zu einem statischen Gleichgewicht mit minimaler freier Energie und maximaler Entropie zu beobachten ist, so können mit BAUER (1920) Lebewesen geradezu als Körpersysteme gekennzeichnet werden, welche die Energie ihrer Umgebung dazu verwenden, dem Eintritt dieses Gleichgewichts entgegenzuwirken. Sie haben also die Fähigkeit, den zeitlichen Ablauf chemischer Umsetzungen zu verzögern. Hierin liegt kein Widerspruch zur klassischen Thermodynamik, weil in ihre Hauptsätze die Zeit nicht eingeht. Daher ist es genauer, einem Organismus für manche Phasen seines Lebens den Zustand eines Fließgleichgewichtes (steady state) zuzusprechen, wie er in der Thermodynamik

1) Als Beispiel einer lokalen Entropieabnahme sei das Wachstum eines Kristalls aus einer gesättigten Lösung erwähnt. Die Entropieabnahme durch die Kristallisation wird durch eine Entropiezunahme der Umgebung kompensiert, die auf die freigesetzte Kristallisationswärme zurückzuführen ist (HAASE 1957).

irreversibler Prozesse analysiert wird.

Faßt man Zellen, Nährmedium und Thermostat zu einem System zusammen, so ist es im Sinne der klassischen Thermodynamik abgeschlossen. Es ist also möglich, in einem solchen System die Gültigkeit des II. Hauptsatzes zu überprüfen und eine Abschätzung der Entropie einer einzelnen Zelle durchzuführen.

Untersucht man mit Hilfe der Kalorimetrie die Vorgänge beim Wachstum von Organismen - hier speziell von einzelligen Lebewesen - in einem solchen abgeschlossenen System, so muß man sich darüber klar sein, daß stets nur integrale Aussagen gewonnen werden. Integral in dem Sinne, daß a) eine Vielzahl von einzelnen Zellen und b) in ihnen verschiedene Prozesse zu der beobachteten Wärmetönung beitragen.

Chemische Reaktionen laufen gewöhnlich unter konstantem Druck ab, d.h. die vom Kalorimeter gemessene Wärme entspricht der Änderung ΔH der Enthalpie H . Ist neben dem Druck p auch das Volumen V konstant, so stimmen nach

$$\Delta U = \Delta H - p \cdot \Delta V \quad (1)$$

ΔH und ΔU (Änderung der inneren Energie) überein. Die in biochemischen Reaktionen auftretenden Volumänderungen sind gewöhnlich so klein, daß man ihren Energiebeitrag vernachlässigen kann. Die beobachtete Wärmetönung ist also ein Maß für die Änderung der Enthalpie bzw. der inneren Energie des untersuchten Systems.

Kennt man die Gleichgewichtskonstante K der Reaktion, so kann nach

$$\Delta G = -R \cdot T \ln K \quad (2)$$

(R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur) die Änderung der Freien Enthalpie G berechnet werden. Aus ΔH und ΔG ist über

$$\Delta G_{iso} = \Delta H_{iso} - T \cdot \Delta S_{iso} \quad (3)$$

die Änderung der Entropie ΔS bei isothermer Versuchsführung zu gewinnen. Andererseits können aus reaktionskinetischen Untersuchungen die Aktivierungsgrößen

ΔH^+ , ΔS^+ und ΔG^+ ermittelt werden (das hochgesetzte $^+$ soll in dieser Arbeit stets auf Aktivierungsgrößen hinweisen). Eine direkte Methode zur Messung von ΔS gibt es nicht. Dieser Mangel wird bei dem Versuch einer Abschätzung der Zellentropie (s. A 6) deutlich werden.

Mit Hilfe der Mikrokalorimetrie sind alle Fragen zu beantworten, die mit dem Umsatz der Energie des Nährmediums durch die Zelle in Zusammenhang stehen. Diese Umwandlungen sind von vielen Parametern abhängig, von denen einige für diese Arbeit besondere Bedeutung haben (s. 4.4). Durch geeignete Wahl der Parameter wird es möglich, bestimmte Energieumsetzungen (z.B. den Betriebsstoffwechsel) in den Vordergrund zu rücken.

In der Kalorimetrie bei verschiedenen Temperaturen und den durch sie gefundenen Aktivierungsgrößen trifft sich die Reaktionskinetik mit der Thermodynamik (s. A 2). Aber auch die so gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten mitteln immer über eine Vielzahl von Teilprozessen und sind daher schwierig zu interpretieren. Konstanten für einzelne Reaktionen können nur in vitro oder mit spezifischen Methoden (z.B. radioaktiver Markierung) in vivo gewonnen werden.

Zusammenfassend läßt sich mit HILL (1924) sagen:

"Thermodynamics may be hard to understand, but not so hard as the living cell; it may be an imperfect tool, but it is better than none; and it enables us often to evade the part which we do not understand in the mechanism of the cell, to draw conclusions directly from observed fact, and to predict the consequences of phenomena which we may not understand but of the existence of which we are sure."

1.2 Größe der zu erwartenden Effekte und Auswahl eines geeigneten Kalorimeters

Nach Angaben aus der Literatur (s.z.B. RUBNER 1904, FINK und JUNG in: HEFEN, Bd. I, S. 326) kann bei verschiedenen Hefearten mit einer Verbrennungswärme zwischen 4.500 und 5.100 cal pro Gramm Trockengewicht gerechnet werden. Eigene Messungen mit einer Mikrobombe nach PHILLIPSON (1964) ergaben in Abhängigkeit vom Wachstumsmedium Verbrennungswärmen zwischen 4.900 und 5.200 cal/g²⁾. Im folgenden soll für eine Abschätzung der Wert

5.000 cal/g Trockengewicht

2) s. S. 5

benutzt werden. Aus ihm ergibt sich mit einem Trockengewicht von $14 \cdot 10^{-12}$ g pro diploide Zelle eine Verbrennungswärme von

$$7 \cdot 10^{-8} \text{ cal / Zelle.}$$

Nimmt man ferner an, daß die Zelle im wesentlichen aus der Glucose des Nährmediums aufgebaut wird, so muß bei einer Verbrennungswärme von

$$3.800 \text{ cal/g Glucose}$$

ein Überschuß von

$$1.200 \text{ cal/g Trockengewicht}$$

in Hefezellen gegenüber der Glucose gespeichert sein. Rechnet man mit einem bei Hefezellen zu beobachtenden Wirkungsgrad von 40 % weiter, so steht der Speicherung von 1.200 cal/g eine Wärmeentwicklung von rund 1.800 cal/g oder

$$2,5 \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle}$$

gegenüber. Bei einer Generationsdauer von etwa 2 Stunden erhält man einen Wärmefluß von ca.

$$1,3 \cdot 10^{-8} \text{ cal/h. Zelle.}$$

Es ist heute unmöglich, einen so kleinen Wärmefluß experimentell zu bestimmen. Die untere Nachweisgrenze von Kalorimetern liegt um rund 5 Zehnerpotenzen höher, so daß man stets gezwungen ist, Populationen zu untersuchen.

Bei Hefen läßt sich ein Endtiter von 10^8 Zellen/ml erreichen. Überstreicht das Wachstum etwa 2 Zehnerpotenzen, so kann man in der Mitte der logarithmischen Phase mit rund 10^7 Zellen oder einer Wärmeerzeugung von

$$10^7 \cdot 1,3 \cdot 10^{-8} = 0,13 \text{ cal/h. ml}$$

rechnen. Damit wird die Nachweisgrenze um den Faktor 100 überschritten.

-
- 2) Dr. Tachoire vom Institut für Mikrokolorimetrie und Thermogenese, Marseille, bestimmte mit einer dort entwickelten Verbrennungsbombe die Verbrennungswärme von in Minimalmedium gewachsenen Zellen des Stammes 211 zu 4.400 cal/g.

Die Generationszeit einer einzelnen Hefezelle läßt sich in mindestens 3 Phasen (G_1 , S, G_2) unterteilen (s. Abb. 1). Die wesentlichen Syntheseleistungen sind

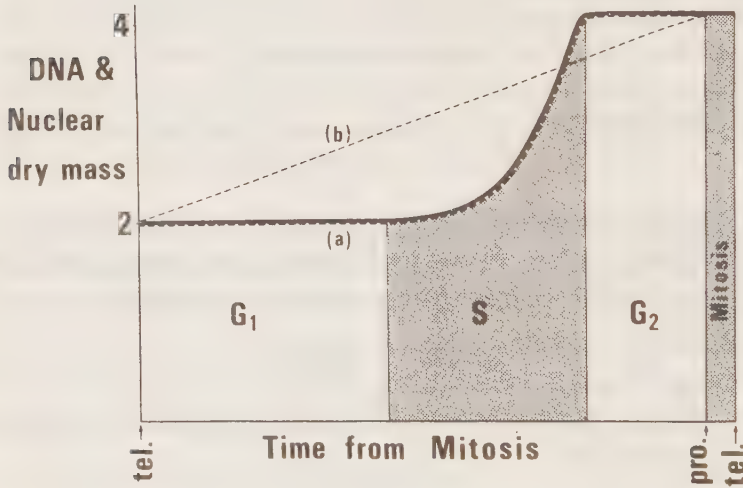


Abb. 1 Generationszeit einer einzelnen Zelle. Kurve (a) gibt die Zunahme der DNS und der Kernsubstanz während eines Zellzyklus (nach CLEAVER 1967).

in der S-Phase zu beobachten, deren Länge für verschiedene Organismen zwischen 25 und 65 % der Zyklusdauer variieren kann. Man muß also mit Prozessen in der Hefezelle und dadurch mit Wärmeflüssen im Kalorimeter rechnen, die eine Halbwertszeit bis zu etwa 15 Minuten hinab haben können. Um solche Flüsse ohne Verzerrung durch die Trägheit des Nachweissystems zu messen, darf die Zeitkonstante des Kalorimeters höchstens einige Minuten betragen.

Andererseits wird bei Versuchen, die sich über mehrere Tage erstrecken, eine extrem hohe Langzeitkonstanz der Thermostaten-Temperatur verlangt. Wenn die

Störungen durch Schwankungen der Umgebungstemperatur 1 % nicht übersteigen sollen, so ist bei einem Wärmefluß von 0,13 cal/h.ml und einem Reaktionsvolumen von 10 ml mit einer Wärmekapazität von rd. 10 cal/° eine Temperaturkonstanz des Thermostaten zu fordern, die besser als

$$0,01 \cdot \frac{0,13 \cdot 10 \text{ cal/h}}{10 \text{ cal/}^{\circ}\text{C}} \approx 10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C/h}$$

ist. Eine solche Konstanz ist bei langen Reaktionszeiten kaum zu erreichen, so daß sich die Differenzmethode anbietet. Die andere Möglichkeit, den Einfluß von Temperaturschwankungen durch Vergrößerung des Reaktionsvolumens herabzusetzen, ist wegen der damit verbundenen Zunahme der Trägheit des Systems nicht durchführbar.

Diese Überlegungen haben zu der Einsicht geführt, daß ein nach dem von TIAN und CALVET entwickeltem Prinzip gebautes Kalorimeter für die geplanten Untersuchungen am geeignetesten ist.

Denn es erfüllt die hier aufgestellten Bedingungen an Empfindlichkeit, Zeitkonstante und Langzeitkonstanz in vollem Umfang.

2. KALORIMETRIE

2.1 Bauformen von Kalorimetern

Seit der Anwendung des ersten Kalorimeters durch CRAWFORD im Jahre 1778 ist eine Vielzahl von Kalorimetern entwickelt worden, die sich in anisotherme, isotherme, adiabatische und differentielle Kalorimeter unterteilen lassen (s. z. B. HOUBENWEYL 1955). Im Rahmen dieser Einteilung erscheint es günstiger, zwischen Geräten, die Temperaturdifferenzen bestimmen oder sie für einen Regelvorgang verwenden, und Instrumenten zu unterscheiden, die einen Wärmefluß messen.

2.1.1 Messung einer Temperaturerhöhung

Eine Änderung der Temperatur des Reaktionsgefäßes läßt sich in einfacher Weise mit einem Thermometer verfolgen. Kennt man die Wärmekapazität des Systems

und den Wärmeaustausch mit der Umgebung, so läßt sich aus der Temperaturdifferenz (zeitlich in einem oder räumlich zwischen zwei Gefäßen) der Wärmeumsatz berechnen. Das klassische Thermometer kann heute durch Thermoelemente oder Thermowiderstände ersetzt werden, ohne daß dadurch das Prinzip der Messung geändert würde.

Entscheidend bei dieser Methode ist die genaue Kenntnis der Wärmekapazität und des Wärmeaustausches mit dem Thermostaten.

2.1.2 Messung eines Wärmeflusses

Kalorimeter, bei denen die freiwerdende Wärme durch einen Schmelz- oder Verdampfungsprozeß absorbiert (isotherme Kalorimeter) oder über Thermoelemente an einen Thermostaten abgeleitet wird, messen einen Wärmefluß zwischen Reaktionszelle und Umgebung. Sie ermöglichen eine weitgehende Isothermie und die Behandlung der Reaktion als Prozeß in einem abgeschlossenen System, da der Wärmeaustausch mit der Umgebung bestimmt wird, man also rechnerisch das System leicht abschließen kann. Der Nachteil der Verdampfungs- und Schmelzkalorimeter, an eine bestimmte Arbeitstemperatur gebunden zu sein, entfällt bei der Verwendung von Thermostülen. Bei Wärmeflußmessern ist es nicht nötig, die Wärmekapazität des Systems zu kennen und, wie bei den meist punktförmigen Temperaturmessungen, Homogenität im Reaktionsgefäß durch Rühren zu erzeugen.

Wärmeflußkalorimeter eignen sich besonders für langsame Prozesse (Versuchsdauer: einige Tage bis zu einigen Monaten, s.z.B. SWIETOSLAWSKI 1946), andererseits aber auch in der von KITZINGER und BENZINGER (1961) entwickelten Form als Wärmestoß (heat burst)-Kalorimeter für sehr schnelle Vorgänge.

2.2 Mikrokalorimeter

2.2.1 Allgemeines über Mikrokalorimeter

Der Ausdruck "Mikrokalorimeter" bezeichnet keine festumrissene Gruppe von Kalorimetern. Weder bedeutet die Vorsilbe "Mikro", daß das Volumen des Reaktionsgefäßes extrem klein ist (einige Milliliter im Wärmestoß-Kalorimeter von

KITZINGER und BENZINGER 1961 gegenüber 400 ml bei HILL 1911), noch daß die zu messenden Wärmeflüsse oder Temperaturdifferenzen sehr gering sind. Wahrscheinlich ist die Bezeichnung "Mikrokalorimeter" mehr aus der historischen Entwicklung als Abgrenzung gegen die zunächst vorherrschenden Tierkalorimeter zu verstehen.

Im folgenden Abschnitt ist das Mikrokalorimeter nach TIAN und CALVET näher beschrieben, einige andere Mikrokalorimeter werden unter 3.1 angeführt, soweit sie für biologische Untersuchungen von Interesse sind.

2.2.2 Das Mikrokalorimeter E. Calvet

Der Aufbau und die Wirkungsweise des Mikrokalorimeters nach TIAN und CALVET ist an verschiedenen Stellen (s.z.B. CALVET und PRAT 1956, CALVET 1962, CALVET und PRAT 1963) ausführlich beschrieben worden. Daher soll hier nur das Prinzip und an den Abb. 2 und 3 die Zuordnung der einzelnen Elemente erläutert werden.

Wenn sich die beiden Lötstellen eines Thermoelementes auf verschiedenen Temperaturen ϑ_1 und ϑ_2 befinden, so liegt zwischen diesen beiden Punkten eine Potentialdifferenz e , deren Größe mit einem Voltmeter bestimmt werden kann. Sie ist der Temperaturdifferenz direkt proportional

$$e = E (\vartheta_1 - \vartheta_2) \quad (4)$$

(E = Thermoelektrische Kraft des verwandten Thermopaars). Es sei ϑ_1 die Temperatur des Reaktionsgefäßes, ϑ_2 die des thermostatischen Blockes. e würde bei bekanntem ϑ_2 die Temperatur der Kammer angeben, wenn die gesamte Kammer und damit auch ihre ganze Oberfläche auf gleicher Temperatur wäre. Da beim Mikrokalorimeter wegen des ungünstigen Verhältnisses von Wachstums- und Rührwärme auf ein Rühren des Kammerinhaltes verzichtet wird, ist diese Voraussetzung nicht erfüllt.

Um dennoch eine Aussage für die gesamte Kammeroberfläche zu gewinnen, ist diese gleichmäßig mit einer großen Anzahl in Reihe geschalteter Thermoelemente

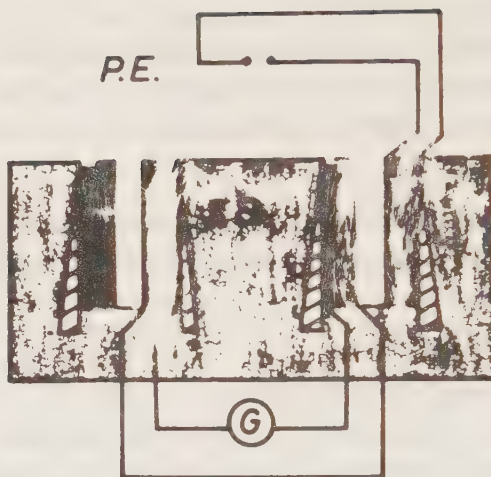


Abb. 2 Querschnitt (schematisch) durch den Thermostatenblock T.B. des Mikrokalorimeters E. Calvet. Die Thermostäulen von Reaktionskammer(rechts) und Gegenkammer (links) sind über ein Galvanometer G in Differenz geschaltet. Die Reaktionskammer kann durch den Peltier-Effekt³⁾ P.E. gekühlt werden (nach BOIVINET 1964).

bedeckt. Jedem Thermoelement ist durch die Konstruktion ein Flächenelement ΔS der Oberfläche zugeordnet.

Entsteht in der Kammer Wärme, so resultiert ein Wärmefluß zum Thermostatenblock.

Der Wärmefluß $\dot{Q}_i$ durch ein bestimmtes Flächenelement ΔS_i wird nur zu einem gewissen Teil λ ($0 < \lambda < 1$) durch das Thermopaar "i" erfolgen. Für diesen Anteil $\lambda \dot{Q}_i$ gilt

$$\lambda \dot{Q}_i = C (\vartheta_{1i} - \vartheta_2) \quad (5)$$

3) Der Peltier-Effekt ist die Umkehrung des Seebeck-Effektes, d.h. der Erscheinung, daß bei einem Temperaturunterschied zwischen den beiden Lötstellen eines Thermoelementes eine Potentialdifferenz auftritt. Verbindet man die freien Schenkel des Thermoelementes über ein Galvanometer, so fließt ein Strom. Wenn man das Galvanometer durch eine Spannungsquelle ersetzt und einen Strom umgekehrter Flußrichtung erzwingt, so läßt sich eine Temperaturdifferenz zwischen den beiden Lötstellen erzeugen (Peltier-Effekt).

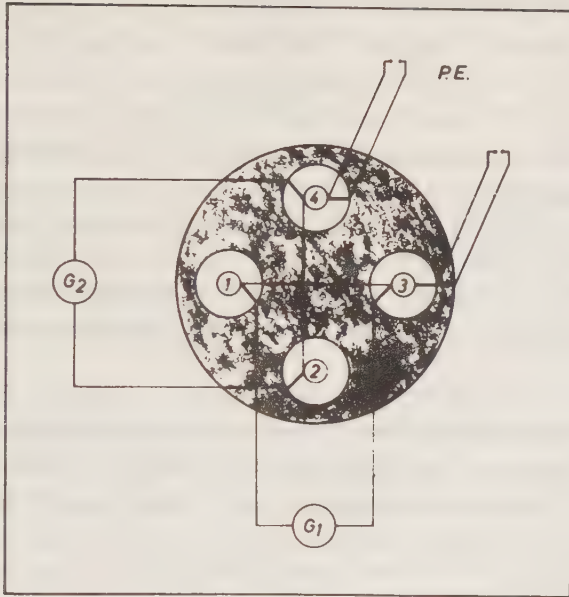


Abb. 3 Aufsicht auf den Thermostatenblock des Mikrokolorimeters E. Calvet mit 2 Diagonalen (1-3; 2-4; schematisch). Unter Diagonale wird die Kombination einer Reaktions- mit einer Gegenkammer verstanden. Bei 2 Diagonalen sind gleichzeitig 2 Messungen durchführbar. G_1 , G_2 : Galvanometer, P.E.: Peltier-Effekt auf beide Reaktionskammern (3 und 4) möglich (nach BOIVINET 1964).

(C = Wärmeleitfähigkeit der Drähte). Dieses Paar " i " zeigt eine Elektromotorische Kraft

$$e_i = \epsilon (\vartheta_{1i} - \vartheta_{2i}). \quad (6)$$

Aus beiden Gleichungen folgt

$$e_i = \frac{\epsilon \lambda}{C} \vartheta_i. \quad (7)$$

Die Thermoelemente des Gerätes sind weitestgehend gleich, so daß für alle Elemente $\epsilon \lambda / C$ denselben Wert hat. Die Summe über die einzelnen e_i

$$E = \sum e_i$$

ist damit proportional zur Summe der Wärmeflüsse

$$\dot{Q} = \sum \dot{Q}_i,$$

und es gilt

$$E = \frac{E \lambda}{C} \dot{Q}.$$

Die Kalorimeteranzeige ist also dem Wärmefluß zwischen Reaktionskammer und Thermostatenblock, das Zeitintegral der Elektromotorischen Kraft E der gesamten transportierten und damit auch gebildeten oder verbrauchten Wärme proportional.

Da die Größe von λ schwer zu ermitteln ist, muß das Kalorimeter mit bekannten Effekten geeicht werden (Joule-Effekt, Lösungswärmen, radioaktiver Zerfall usw., s. 7.2.).

Bei Temperaturänderungen mit einer Zeitkonstanten, die groß gegenüber der des Kalorimeters ist, herrscht stets ein stationäres Gleichgewicht, so daß das Mikrokalorimeter E. Calvet einen Wärmeflußmesser darstellt. Seine Kenngröße ist demnach der kleinste noch nachweisbare Wärmefuß (z.B. in μW), nicht aber eine kleinste Temperaturdifferenz.

3. BIOLOGISCHE KALORIMETRIE

3.1 Allgemeine Entwicklung der biologischen Kalorimetrie

Die ersten Kalorimeter, die 1778 von CRAWFORD und zwei Jahre später von LAVOISIER und LAPLACE gebaut wurden, dienten schon zur Wärmemessung an biologischen Systemen, allerdings ausschließlich an Kleintieren. Mit RUBNER begann rund 100 Jahre später die Kalorimetrie von Mikroorganismen. Er züchtete verschiedene Bakterien- und Hefearten in Dewargefäßen und bestimmte die Erwärmung des Systems während des Wachstums (RUBNER 1903, 1904, 1906, 1911). MEYERHOF (1926) baute diese Methoden weiter aus. HILL (1911) führte mit der Messung einer Temperaturdifferenz durch Thermoelemente zwischen einem Wachstums- und einem Bezugsgefäß die Differentialkalorimetrie ein.

SWIETOSLAWSKI (1935, 1946) verfeinerte das JUNKERSsche Labyrinthfluß-Kalorimeter so weit, daß es auch für biologische Untersuchungen eingesetzt werden konnte.

1933 schlugen COON und DANIELS ein isothermes Kalorimeter für langsame Prozesse vor, bei dem die auftretende Erwärmung durch Verdampfen von Tetrachlorkohlenstoff kompensiert und die abgegebene Wärme aus dem Gewicht des verdampften CCl_4 ermittelt wurde. Diese Methode gestattet allerdings nicht, den Verlauf und damit die Kinetik der Prozesse zu verfolgen.

MOLLIARD (1922) griff RUBNERs Methode (der indirekten Kalorimetrie) auf, die Verbrennungswärmen des Mediums zu Beginn und am Ende des Versuches und der gewachsenen Zellen mit der Atmungswärme zu vergleichen, die sich aus dem beim Wachstum entwickelten Kohlendioxid berechnen läßt.

Die Energieabgabe als Funktion der Zeit beim Wachstum von *E. coli* und anderen Bakterien verfolgten BAYNE - JONES und RHEES (1929) und SCHMIDT und BAYNE - JONES (1933) mit einem Differentialkalorimeter nach BAYNE - JONES (1929).

Berechnungen von WHIPP (1934) über den günstigsten Bau von Differential-Mikrokalorimetern mit Thermoelementen führten zu entsprechenden Gleichungen, wie sie von TIAN und CALVET (s. CALVET und PRAT 1956) angegeben wurden.

BUZELL und STURTEVANT (1951) entwickelten ein nicht-isothermes Zwillingskalorimeter, bei dem durch einen elektrischen Strom in der Bezugskammer automatisch dieselbe Temperaturerhöhung erzeugt wurde wie durch die Reaktion in der Reaktionskammer. Das Zeitintegral des Stromes diente als Maß für die freigesetzte Wärme.

Ein speziell für biochemische Untersuchungen an kleinen Substanzmengen geschaffenes Wärmestoß ("heat burst")-Kalorimeter beschreiben BENZINGER und KITZINGER (1954), (1963), STEINER und KITZINGER (1956).

Der Prototyp des TIAN-CALVETschen Mikrokolorimeters ist mehrfach in Abwandlungen nachgebaut und für biologische und biochemische Messungen eingesetzt worden, so z. B. von CANADY und LAIDLER (1958) und EVANS und CARNEY (1965).

Kalorimetrische Untersuchungen speziell an *S. cerevisiae* (Hansen) führte

BATTLE (1956, 1960 a, 1960 b) aus. Seine Ergebnisse werden an anderer Stelle (8.3) zitiert.

OHLMEYER (1946) entwickelte ein Kalorimeter in Thermostatenart. Im Blindversuch wurde eine bestimmte Heizung, d.h. bei konstantem Heizstrom ein bestimmter Quotient Heizdauer/Versuchsdauer benötigt, um die Temperatur im Gefäß konstant zu halten. Ließen exergone Prozesse ab, so wurden die Heizzeiten kürzer; die Differenz der Heizzeiten im Blindversuch und während der Reaktion waren der abgegebenen Wärme proportional. Dieses Kalorimeter wurde von OHLMEYER und FRITZ (1966) speziell für Stoffwechseluntersuchungen an Hefen eingesetzt.

ZABŁOCKI und Mitarbeiter maßen mit einem gut zu belüftenden 400 ml-Kalorimeter Wachstumswärme und Energiespeicherung von *E. coli* sowie den Umsatz von Glucose als Baustoff und fanden eine deutliche Diskrepanz zwischen der Thermogenese und der Biosynthese (CZERNIAWSKI 1964, SEDLACZEK et al. 1965, 1966), CZERNIAWSKI et al. 1965, ZABŁOCKI et al. 1965).

Der von TIAN und CALVET für ihr Mikrokalorimeter entwickelte Gedanke der Wärmekompensation durch den Peltier-Effekt wurde von WALISCH und BECKER (1963, 1965 a, 1965 b) aufgenommen und in ihrem Kalorimeter durch SIRIGOR-Peltier-Batterien verwirklicht. Bei automatischer Steuerung ist das Zeitintegral des Peltierstromes ein Maß für die Wärmeentwicklung.⁴⁾

Überblicke über die Kalorimetrie und ihre Anwendungen in der Biologie findet man u.a. bei WHITE (1928), SWIETOSLAWSKI (1946), KLEIBER (1950, 1967), HOUBENWEYL (1956), ROTH und BECKER (1956) und KARASZ (1963).

3.2 Messungen mit dem Mikrokalorimeter E. Calvet

Neben zahlreichen Anwendungen auf chemischen und radiologischen Gebieten ist das Mikrokalorimeter E. Calvet besonders häufig für biologische Untersuchungen eingesetzt worden. Außer den bei CALVET und PRAT (1956, 1963) angeführten

4) Dieses Kalorimeter ist wohl bislang nicht für biologische Untersuchungen eingesetzt worden.

Arbeiten sei auf die folgenden Vorträge⁵⁾ hingewiesen: von PRAT (1967) über die Beziehungen zwischen Mikrokalorimetrie und Thermobiologie, von SIMONART und LAUDELOUT (1967) über die Kinetik der Oxidation von Nitriten durch *Nitrobacter*, von BELAICH und SENEZ (1967) über die Energetik des Bakterienwachstums und von ZABŁOCKI et al. (1967) über die thermische Bilanz beim Wachstum von *E.coli*. BELAICH (1963) bestimmte den Stoffwechsel von *P. lindneri* unter verschiedenen Bedingungen und SENEZ und BELAICH (1965) maßen den Einfluß der Phosphatkonzentration des Mediums auf das Wachstum verschiedener Bakterien.

HERMANS und RIALDI (1965) sowie RIALDI und HERMANS (1966) untersuchten die Ionisationswärme bei Denaturierung von Myoglobin und beim Helix-Coil-Übergang von Poly-Glutaminsäure, BROWN et al. (1965) den Glucose-Transport durch verschiedene Membranen.

Bei BOIVINET (1964) finden sich Thermogramme für verschiedene Mikroorganismen und für Wachstum unter variablen Bedingungen.

Schließlich weist CALVET (1962) auf die Möglichkeit hin, das Mikrokalorimeter mit Vorteil für differential-thermoanalytische Untersuchungen einzusetzen⁶⁾.

4. DAS MIKROKALORIMETER E. CALVET UND AUFGABENSTELLUNG

4.1 Entwicklung und Prinzip des Mikrokalorimeters E. Calvet

Das Prinzip des Mikrokalorimeters E. Calvet ist in 2.2.2 geschildert worden. Es geht auf erste Untersuchungen von TIAN zurück. Zur Erreichung einer maximalen Temperaturkonstanz senkte TIAN das Instrument in den gewachsenen Boden im Keller seines Institutes ein. In der Folge wurde eine Reihe konzentrischer Zylinder zur

5) Alle Vorträge gehalten auf dem Internationalen Colloquium der C.N.R.S. in Marseille 1965, im Druck erschienen 1967

6) Hier ist allerdings als Kritik anzumelden, daß die langsamen Aufheizgeschwindigkeiten und die wegen fehlender Kühlmöglichkeiten extrem langen Abkühlzeiten den Einsatz des Mikrokalorimeters E. Calvet als Differential-Thermoanalysator oder als Differential-Scanning-Calorimeter ungeeignet erscheinen lassen.

thermischen Isolierung der Meßkammer um den Thermostatenblock gelegt und der Wärmeflußmesser, der schon im ersten Modell die Oberfläche des Meßgefäßes gleichmäßig bedeckte, in 2 verschieden große Säulen unterteilt. Je nach Aufgabenstellung konnte die größere oder die kleinere Säule zur Anzeige des Wärmeflusses, die andere zur Peltier-Kompensation der auftretenden Wärme benutzt werden.

4.2 Das kommerzielle Gerät

Das Mikrokalorimeter E. Calvet wird heute in einer Tieftemperaturausführung (bis 200°C) und einer Hochtemperaturausführung (bis 1.000°C) von der Firma DAM in Lyon hergestellt. Eine genaue Beschreibung findet man bei CALVET und PRAT (1956, 1963). Daher sei hier nur eine kurze Darstellung an Hand der Abb. 4 a und 4 b gegeben.

Der Reaktionsraum (1) wird von oben durch die Einführöhre (2) mit der Reaktionskammer beschickt, die einen sehr guten thermischen Kontakt zu der Wandung des Raumes (1) hat. Die Außenseite dieser Wandung wird über 496 Thermoelemente (3) mit dem Thermostatenblock (4) verbunden. Zur Abschirmung thermischer Störungen ist der Block mit einer abwechselnden Folge von gut und schlecht leitenden konzentrischen Zylindern (5) umgeben, die ihrerseits in einer Isoliermasse (6) ruhen. Der Thermostatenblock (4) liegt zwischen zwei Metallkonen (7), die eine von oben oder unten kommende punktförmige Störung gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche von (4) verteilen (Prinzip der thermischen Linse).

Das empfindliche Organ des Mikrokalorimeters ist der Wärmeflußmesser (3), der aus maximal 496 Thermoelementen besteht. Sie sind in 16 Scheiben (3a) zu je 31 Elementen angeordnet, die hochkant stehend den Reaktionsraum (1) mit dem Thermostatenblock (4) verbinden und die Oberfläche von (1) gleichmäßig überdecken. 12 Scheiben sind zu einer großen, die restlichen 4 Scheiben zu einer kleinen Thermosäule zusammengeschaltet. Dadurch wird es möglich, das Mikrokalorimeter in drei Empfindlichkeitsstufen (kleine Säule, große Säule, kleine plus große Säule) zu benutzen. Außerdem kann so ein Teil der Thermoelemente zur Erzeugung des

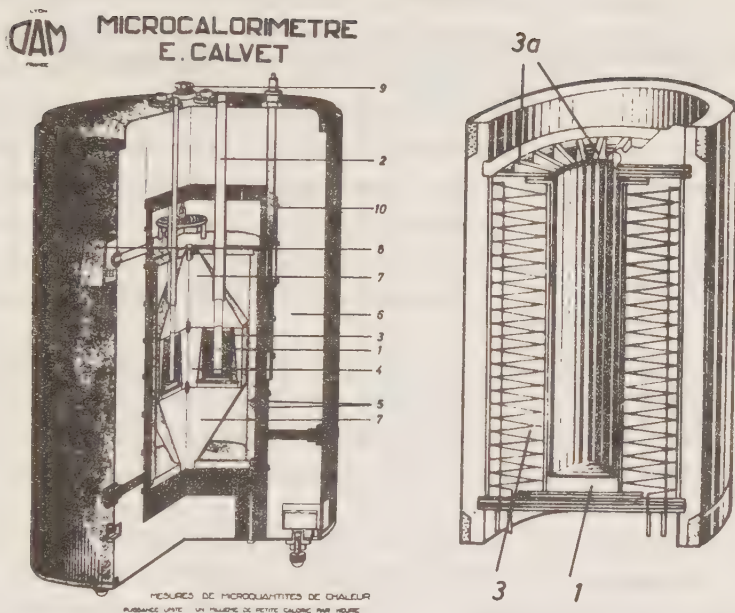


Abb. 4 Schnitt durch das Mikrokolorimeter E. Calvet (a) und eine Meßkammer (b) - (nach einem Prospekt der Firma DAM/Lyon). 1: Reaktionsraum; 2: Einführrohre; 3: Thermostäulen; 3a: Glimmerscheiben mit je 31 Thermoelementen; 4: Thermostatenblock; 5: Konzentrische Zylinder zur Abschirmung von thermischen Störungen; 6: Isoliermasse; 7: Metallkonen; 8: Anschlußkasten für Galvanometer und Peltier-Quelle; 9: Drehschalter zur Auswahl der Empfindlichkeit; 10: Heizspiralen

Peltier-Effektes, der Rest zur Anzeige des trotz der Kompensation verbleibenden Wärmeflusses verwendet werden. Die Verbindung der Thermostäulen mit dem Galvanometer oder der Peltier-Batterie erfolgt über den Anschlußkasten (8), die Auswahl der Empfindlichkeit durch den Drehschalter (9).

In Abb. 4a ist ein Doppelkolorimeter dargestellt, das 2 Diagonalen hat, also gleichzeitig 2 Versuche durchzuführen gestattet. In Tab. 1 sind einige charakteristische Daten des Instrumentes zusammengefaßt.

Tabelle 1

CHARAKTERISTISCHE DATEN DES BENUTZTEN MIKROKALORIMETERS
E. CALVET

Anzahl der Diagonalen	2
Kammervolumen	15 ml
Temperaturbereich	Umgebungstemp. bis 200° C
Anzahl der Thermoelemente	
große Säule	372 Elemente
kleine Säule	124 Elemente
zusammen	496 Elemente
Empfindlichkeit	
große Säule	ca. $3 \cdot 10^{-8}$ V/ μ W
kleine Säule	ca. $1 \cdot 10^{-8}$ "
zusammen	ca. $4 \cdot 10^{-8}$ "
Widerstand der Säulen zusammen	ca. 88 Ω
Anwendungsbereich	einige μ W bis 1 W
Zeitkonstante	ca. 3 min.
Peltierstrom	
gewöhnlich im Bereich von	10 μ A bis 10 mA

4.3 Möglichkeiten des Gerätes

Der Anwendungsbereich des Mikrokalorimeters E. Calvet wird einerseits durch seine große Empfindlichkeit von einigen μW , andererseits durch das geringe Volumen des Reaktionsgefäßes (max. 15 ml) abgesteckt. Seine Zeitkonstante von rund 3 min. erlaubt, biologische Vorgänge mit Oszillationen dieser Größenordnung zu verfolgen, macht es aber für "ballistische" Untersuchungen von sehr schnell ablaufenden Enzymreaktionen weniger geeignet. Die Arbeitstemperatur des Kalorimeters läßt sich im ganzen biologisch interessanten Temperaturbereich frei wählen, doch ist darauf zu achten, daß die Umgebungstemperatur nach Möglichkeit 5°C kleiner als die Arbeitstemperatur ist.

Wegen der großen Empfindlichkeit ist es schwierig, den Kammerinhalt zu rühren (Auftreten von Reibungswärme, s. 7.3) oder durch Einleiten von Luft mit Sauerstoff zu sättigen (s. 7.3). Anaerobes Wachstum oder anaerober Betriebsstoffwechsel sind daher ein besonders geeignetes biologisches Untersuchungsgebiet.

Durch die gute thermische Isolierung und das Fehlen einer Kühlung bedingt, ist es langwierig, von einer höheren zu einer tieferen Temperatur überzugehen, insbesondere also das Gerät im Sinne einer Differential-Thermoanalyse oder als Differential-Scanning-Calorimeter zu benutzen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Mikrokalorimeter E. Calvet im biologischen Bereich am günstigsten für Prozesse einzusetzen ist, die bei konstanter Temperatur unter Stickstoff ohne Rühren ablaufen können und Wärmen von einigen cal abgeben.

4.4 Aufgabenstellung

Am Institut für Biophysik, in dem die hier dargestellten Messungen durchgeführt worden sind, wird vornehmlich der Einfluß von ultravioletem Licht und ionisierenden Strahlen auf Hefen (*Sacch. cerevisiae*) mit genetischen und biochemischen Verfahren untersucht. Es erschien daher interessant, durch thermodynamische Messungen, also durch eine rein physikalische Methode, ergänzende Informationen zu gewinnen.

Um das Verhalten von bestrahlten Populationen thermodynamisch deuten zu können, sollen im Rahmen dieser Arbeit Thermogramme, d.h. Wärmeflußkurven des Wachstums unbestrahlter Zellen mit dem Mikrokalorimeter aufgenommen und der Einfluß von einigen physikalischen und biologischen Parametern studiert werden. Bei diesen Parametern ist hauptsächlich an Temperatur, Zusammensetzung des Mediums, Form der Energiequelle, Sauerstoffangebot und Vorbehandlung, Entwicklungszustand und Ploidiegrad der Zellen gedacht. Es ist zu ermitteln, wie die Zelle das Nährstoffangebot verschiedener Medien auszunutzen vermag, mit welchem Wirkungsgrad die zur Verfügung stehende freie Energie in energiereiche Bindungen umgewandelt, d.h. gespeichert und wieviel Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Weiter soll versucht werden, durch spezielle Versuchführung Unterschiede zwischen Baustoffwechsel, Betriebsstoffwechsel und einem Energieumsatz zu finden, der für mögliche Reparaturprozesse benötigt wird, und aus der Temperaturabhängigkeit der Energieumwandlungsgeschwindigkeit Aktivierungsgrößen zu berechnen.

Mit diesen Kenntnissen über unbestrahlte Zellen sind dann erste Thermogramme für bestrahlte Zellen in Abhängigkeit verschiedener Bestrahlungsdosen zu interpretieren.

Schließlich soll in einem Anhang dargestellt werden, wie man aus den gewonnenen Meßergebnissen und/ oder durch spezielle Annahmen über den Aufbau von Zellen zu einer Abschätzung der Zellentropie kommt.

5. APPARATIVER AUFBAU

5.1 Einrichtung des Meßraumes

Um die volle Empfindlichkeit des Mikrokalorimeters ausnutzen zu können, muß ein Raum vorhanden sein, der vibrationsfrei ist und eine gute Temperaturkonstanz ermöglicht. Als solcher dient eine ebenerdige Kammer ohne Außenwände, die von ungefähr gleichtemperierten Zimmern umgeben ist. Der eigentliche Meßraum mit $4,6 \text{ m}^2$ Grundfläche und 13 m^3 Luftraum ist nur über eine Schleuse von 10 m^3 zu

betreten, in der die Integratoren und das Temperaturprogrammgerät (s.u.) aufgestellt sind. Diese Schleuse besitzt eine durch einen schweren Friesvorhang abgedeckte Schiebetür nach außen (s. Abb. 5).

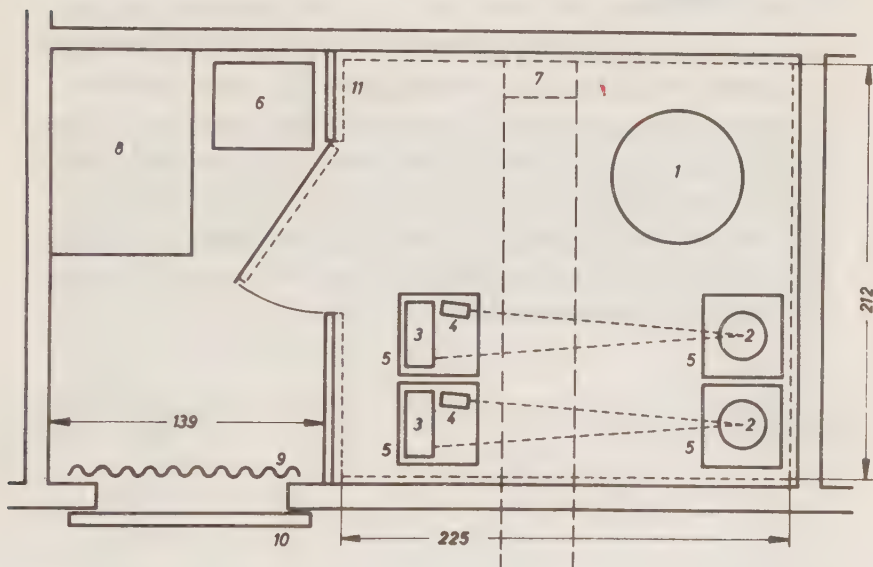


Abb. 5 Einrichtung von Kalarimeterraum und Schleuse
 1: Mikrokalorimeter; 2: Galvanometer; 3: Lichtpunktfolgeschreiber; 4: Beleuchtungseinrichtung; 5: Betonklötze zur erschütterungsfreien Aufstellung der Galvanometer und Schreiber; 6: Temperaturregelgerät und Integratoren; 7: Zuluftkanal des Klimageräts; 8: Arbeitstisch; 9: Friesvorhang; 10: Schiebetür; 11: Isolierung der Wände

Um den Einfluß der äußeren Temperaturschwankungen auf den Meßraum zu vermindern, wurde ein senkrecht verlaufender Holzlattenrost auf die Innenwände geschraubt und mit 20 mm starken Styropor-Platten beklebt. Durch diesen Rost entsteht zwischen Wand und Styropor-Platten ein zusätzlicher, 20 mm tiefer, durch senkrechte Trennleisten unterteilter Luftraum. Die Decke der Kammer wurde um 0,50 m abgesenkt und gleichfalls mit Styropor belegt.

Die ebenso isolierte Tür zwischen Schleuse und Kalorimeterraum besitzt ein kleines Fenster, um Druckunterschiede beim Öffnen oder Schließen der Tür zu vermeiden, die zu Erschütterungen der Galvanometer führen könnten.

5.2 Klimagerät

Die Temperatur der Kalorimeterkammer wird durch ein Klimagerät LKG 340 HE der Firma LINDE auf etwa $\pm 0,5$ bis 1°C konstant gehalten (s. Abb. 6). Das Gerät ist auf einer Wandkonsole in einem Vorratsraum aufgestellt und über einen Zu- und einen Abluftkanal mit der Kammer verbunden. Der Temperaturfühler befindet sich unmittelbar vor der Eintrittsöffnung des Abluftkanals. Durch die Aufstellung des Klimagerätes in dem Vorratsraum ist eine relativ konstante Temperatur der Luft beim Eintritt in das Gerät gewährleistet, andererseits vermindert die räumliche Trennung störende Vibrationen im Meßraum.

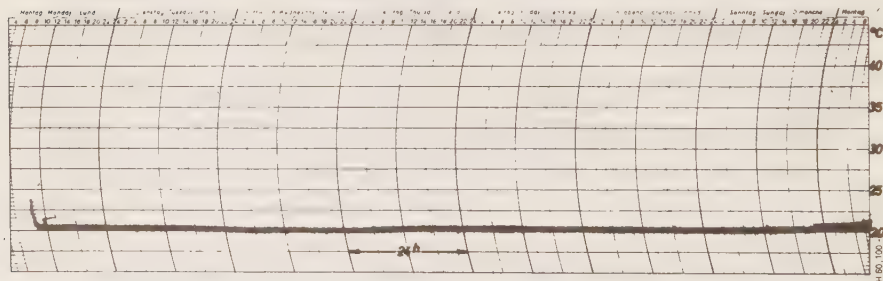


Abb. 6 Verlauf der Temperatur des Kalorimeterraumes während einer Woche, aufgezeichnet mit einem Bimetallstreifen-Thermographen (Firma LAMBRECHT/Göttingen). Die Schwankungen bleiben innerhalb $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Da das LKG 340 HE sowohl heizen als auch kühlen kann, ist die Regelung in einem weiten Temperaturbereich möglich. Dieser Punkt hat für Messungen mit dem Mikrokalorimeter besondere Bedeutung, da die Raumtemperatur mindestens 5°C unter der Arbeitstemperatur liegen sollte, um Kondenswasserbildung im Inneren des Kalorimeters zu vermeiden.

Die Notwendigkeit einer guten Temperaturkonstanz ist aus Abb. 7 zu erkennen, die den Einfluß willkürlicher Schwankungen auf die Anzeige des Kalorimeters wiedergibt.

Bei größter Anzeigeempfindlichkeit überlagern sich den Thermogrammen kleine sinusartige Schwingungen, die von den durch das periodisch arbeitende Klimagerät erzeugten Schwankungen der Raumtemperatur stammen.

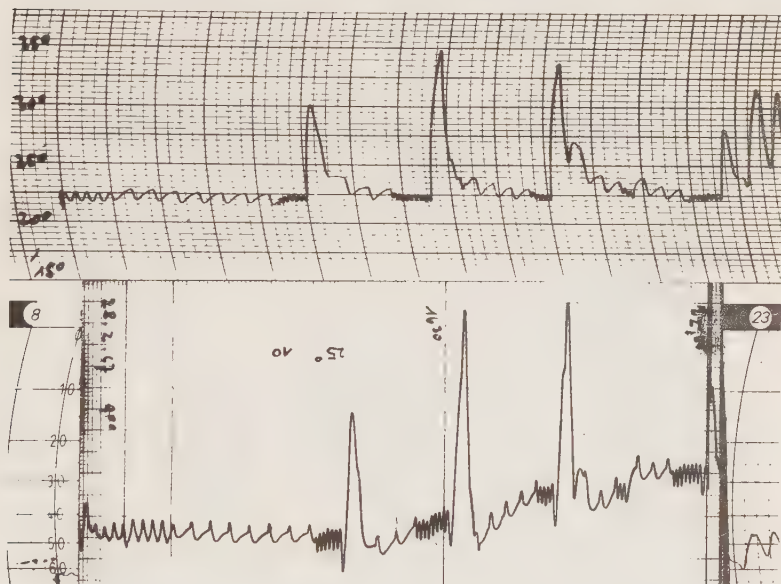


Abb. 7 Einfluß willkürlicher Schwankungen der Umgebungstemperatur auf die Kalorimeteranzeige, Arbeitstemperatur 25°C .
Oben: Raumtemperatur von einem Bimetallstreifenthermograph aufgezeichnet; unten: Kalorimeteranzeige im Leerversuch. Die Nullpunkt-drift der Kalorimeteranzeige hat andere Ursachen.

5.3 Galvanometer

Im Mikrokalorimeter wird der Wärmefluß zwischen Reaktionskammer und Thermostatenblock durch die Thermostäulen in eine EMK umgewandelt (s. 2.2.2). Als

Richtwert gibt die Herstellerfirma eine maximale Empfindlichkeit von $4 \cdot 10^{-8}$ V / μ W an (s. Tab. 1).

Um noch Leistungen der Größenordnung 10 μ W nachweisen zu können, muß man bei 1 m Skalenabstand und einer Auflösbarkeit von 2 mm Galvanometer mit einer Spannungskonstanten von ungefähr $2 \cdot 10^{-7}$ V/mm/m (d.h. einer Spannungsempfindlichkeit 4 mm / μ V) verwenden.

Hier werden höchst spannungsempfindliche Galvanometer der Firma RUHSTRAT, Typ HSG 2 mit folgenden Kenndaten benutzt:

Tabelle 2

CHARAKTERISTISCHE DATEN DER BEIDEN BENUTZTEN
GALVANOMETER ⁷⁾

HSG 2 Nr. 43336/		1	2	
Spannungskonstante	C_U	$7,5 \div 2,4$	$7,4 \div 2,3 \cdot 10^{-7}$	V/mm/m
Stromkonstante	C_i	$1,7 \div 5$	$1,5 \div 4,8 \cdot 10^{-9}$	A/mm/m
Spannungsempfindl.	S_U	$1,3 \div 4,2$	$1,3 \div 4,3$	mm/ μ V
Stromempfindlichkeit	S_i	$590 \div 200$	$670 \div 210$	mm/ μ A
Innerer Widerstand	R_g	47,7	45,4	Ω
Äußerer Grenzwst.	R_{gGr}	$460 \div 1$	$450 \div 1$	Ω

Um die Empfindlichkeit der Galvanometer reduzieren zu können, sind ihnen Empfindlichkeitsregler (RUHSTRAT / Göttingen, Typ ER 3 D) vorgeschaltet. Diese Regler sind so ausgelegt, daß die kritische Dämpfung der Galvanometer und die Belastung der Meßkreise in allen Regelstufen konstant bleiben und die Empfindlichkeit in Zehner- und Dreierschritten verringert werden kann.

7) Die beiden jeweils aufgeführten Werte geben die Grenzen des Bereiches an, der durch Änderung des magnetischen Nebenschlusses überstrichen wird.

5.4 Aufstellung der Galvanometer

Da das Institut für Biophysik relativ leicht gebaut ist und an einer vielbefahrenen Straße liegt, mußte für eine besondere erschütterungsfreie Aufstellung der Galvanometer und Nachlaufsreiber gesorgt werden. Es wurden Winkeleisenrahmen von $40 \times 40 \times 50$ cm Kantenlänge mit Beton ausgegossen. Diese rund 200 kg schweren Klötze ruhen auf je 4 Filgumin-Platten von 4×4 cm ⁸⁾. Dauerversuche mit den Galvanometern zeigten, daß mit einer solchen Aufstellung alle Gebäudeschwingungen abgeschirmt werden können (s. Abb.8).

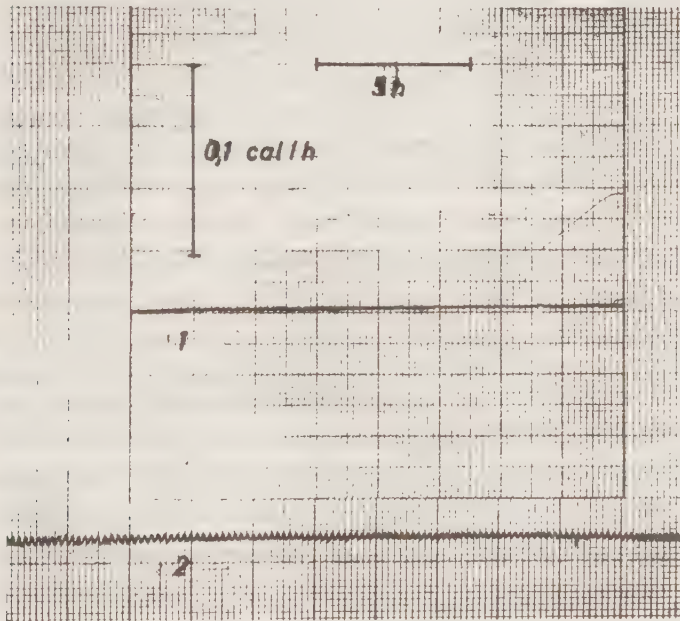


Abb. 8: Kalorimeteranzeige im Leerversuch (maximale Empfindlichkeit)
1: ohne Klimagerät; 2: mit eingeschaltetem Klimagerät.
In 1 fehlen die periodischen Schwingungen, die durch das Klimagerät entstehen, doch ist keine Langzeitkonstanz der Temperatur zu erreichen.

8) Diese Filgumin-Platten wurden liebenswürdigerweise von Herrn MOLLNAU, von dem auch der Hinweis auf diese Dämpfungsmöglichkeit stammt, der Firma J. LÖFFLER, Berlin-Zehlendorf, zur Verfügung gestellt.

Auf die Betonblöcke wurden Aluminiumbleche geschraubt, die kleine Einsenkungen für die Galvanometer- und Nachlaufschreiber-Füße besitzen und damit für eine genaue Fixierung des Abstandes Galvanometer - Schreiber sorgen.

5.5 Lichtpunktfolgeschreiber

Die Ausschläge der beiden Galvanometer HSG 2 werden mit zwei Lichtpunktfolgeschreibern PHOTODYNE der Firma SEFRAM/Paris als Funktion der Zeit aufgezeichnet.

Der am Galvanometerspiegel reflektierte Lichtstrahl fällt auf einen an einem Wagen befestigten Photowiderstand. Dieser ist durch einen horizontalen schwarzen Balken in eine untere und eine obere Hälfte, die obere Hälfte noch einmal vertikal in zwei Quadranten geteilt. Die so entstandenen 3 Photowiderstände liegen in einer im neutralen Zustand abgeglichenen Brückenschaltung. Wird das Anzeigesystem horizontal nicht symmetrisch beleuchtet, so ändern die beiden oberen Quadranten ihre Widerstände und verstimmen die Brücke. Die resultierende Spannung steuert nach Verstärkung einen Motor, der den Wagen so bewegt, daß der Photowiderstand erneut symmetrisch im Lichtstrahl steht. Die Bewegung des Wagens wird aufgezeichnet.

Für langsam ablaufende Prozesse ist beim PHOTODYNE neben den üblichen Tinten- und Kugelschreibern eine elektrische Registrierung möglich. Zwischen einer am Wagen befestigten Spitze und der das Papier tragenden Grundplatte liegt eine Gleichspannung von etwa 80 V. Die überspringenden Funken brennen eine dünne Spur in Metallpapier, so daß man mit Papiervorschüben von 1 cm/h und weniger arbeiten kann.

Der PHOTODYNE ist zum Aufzeichnen von Prozessen geeignet, bei denen Frequenzen unter 1 Hz bei Auslenkgeschwindigkeiten unter 600 mm/s auftreten. Er besitzt ein Folgepotentiometer von etwa 9.000 Ω , an dem der Wagen eine Teilspannung abgreift, die dem augenblicklichen Ausschlag direkt proportional ist und zur Integration der aufgezeichneten Kurve dienen kann.

5.6 Integratoren

Mit Hilfe eines nachgeschalteten Integrators (elektronischer Integrator INTEGRONIC IG 3 der Firma TACUSSEL/Lyon) kann die vom Nachlaufschreiber aufgezeichnete Kurve sofort integriert, d.h. die Fläche unter der Kurve und damit die gesamte abgegebene Wärme bestimmt werden.

Die an dem Folgepotentiometer des Nachlaufschreibers abgegriffene und verstärkte Teilspannung steuert die Umlaufgeschwindigkeit eines Gleichstrommotors, auf dessen Achse eine Sektorblende sitzt. Sie rotiert zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle und unterbricht periodisch den Lichtweg. Die entstehenden Impulse werden umgeformt und auf 2 Dekatronröhren und einen mechanischen Zähler gegeben. Der an den Zähleinheiten abgelesene Wert ist demnach der Zahl der Umläufe, damit der Umlaufgeschwindigkeit und der Teilspannung am Potentiometer proportional, gibt also die Summe der Ausschläge in der Zeit, d.h. die Fläche unter der Kurve an.

Da die Anzeige von der am Folgepotentiometer angelegten Spannung abhängig ist, muß der Integrator für die jeweilige Spannungsquelle geeicht werden, indem beliebige Ausschläge am Lichtpunktfolgeschreiber eingestellt und die zugehörigen Integratoranzeigen pro Minute ermittelt werden. Von Zeit zu Zeit sind diese Eichungen zu wiederholen.

Aus der Integratoranzeige kann nur die gesamte abgegebene Wärme, nicht aber das zeitliche Verhalten abgelesen werden. Daher wurden die Thermogramme zusätzlich durch Auszählen der Flächeneinheiten unter der Kurve und durch Planimetrieren mit einem Kompensationspolarplanimeter der Firma OTT / Kempton ausgewertet.

5.7 Temperatusteuergerät R.T. 64

Das ebenso wie das Kalorimeter von der Société DAM/Lyon gebaute Temperatusteuergerät R.T. 64 kann in dreifacher Weise verwendet werden:

- 1) zur manuellen Steuerung eines Aufheizvorganges. Dabei wird die Spannung am Heizwiderstand von Hand eingestellt.

- 2) zur isothermen Regelung des Kalorimeters.
- 3) zur Steuerung nach einem vorgewählten linearen Temperaturprogramm mit isothermer Regelung nach Erreichen der gewünschten Endtemperatur.

Bei den vorliegenden Untersuchungen ist das R.T. 64 nur nach 2) benutzt worden.

Die gewünschte Arbeitstemperatur des Kalorimeters kann an einem 10-Gang-Potentiometer auf $1/10^{\circ}\text{C}$ (im Bereich bis 100°C , im Bereich bis 200°C auf $2/10^{\circ}\text{C}$) genau eingestellt werden. Dieses Potentiometer liefert eine der gewünschten Temperatur proportionale Spannung, die mit der Spannung eines im Kalorimeter befindlichen Thermoelements verglichen wird. Die Spannungsdifferenz regelt die Heizspannung, und zwar sind proportionales, integrales und differentielles Regelverhalten und der Anteil der differentiellen Regelung getrennt einstellbar.

Um eine Kühlung des Mikrokalorimeters und eine Kondenswasserbildung im Inneren zu umgehen, sollte die Raumtemperatur mindestens 5°C unter der Arbeitstemperatur des Kalorimeters liegen.

5.8 Kalorimeter-Einsätze

Wachstumskammern: Als Wachstumsgefäße werden dünnwandige Zylinder aus rostfreiem Stahl verwendet (s. Abb. 9), die über einen wärmeisolierenden Teflonstopfen mit dem Gestänge verbunden sind und einen guten Kontakt zur Kalorimeterwandung haben. Bei normalen Experimenten werden sie mit 10 ml Medium gefüllt.

Wachstum auf Agarmedium: Für Messungen des Wachstums auf Agarmedium wird ein gleichmäßiger Agarmantel an den Kammerwänden erzeugt. Dazu dienen Stempel verschiedenen Durchmessers (9 bis 14 mm), die den heißen, flüssigen Agar an den Wänden hochdrücken und einen Hohlzylinder erzeugen. Nach dem Erkalten des Mediums können die Stempel entfernt werden. Um eine Zerstörung des Agarmantels durch den beim Herausziehen entstehenden Unterdruck zu vermeiden, tragen die Stempel in der Mitte eine Bohrung, durch die der Druckausgleich erfolgt. Solange der Agar flüssig ist, wird die Bohrung durch einen Messingstift verschlossen gehalten (s. Abb. 9).

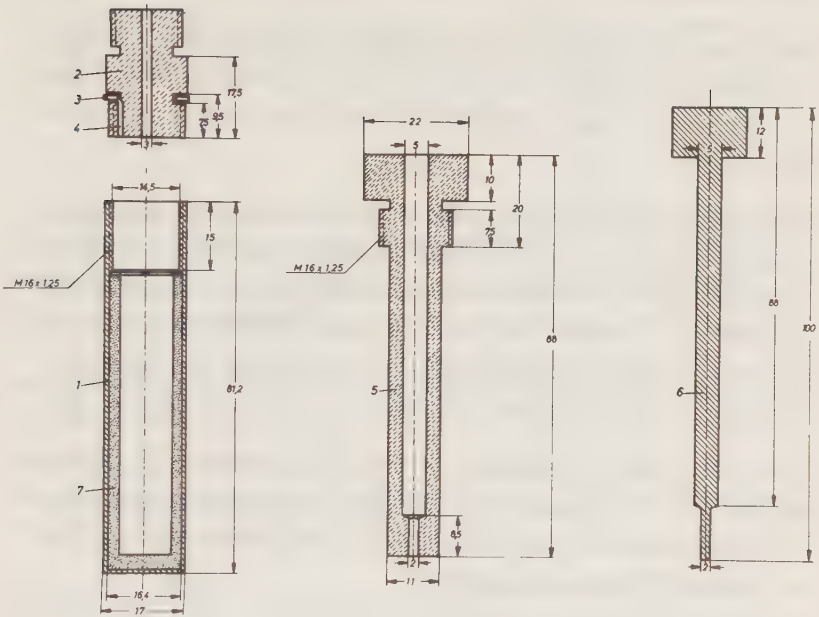


Abb. 9 Schnitt durch Kalorimereinsatz, Teflonverschraubung und Plexiglasstempel zum Erzeugen eines Agarmantels in der Kammer. 1: Stahlkammer mit Innengewinde; 2: Teflonverbindungsstück zum Gestänge mit 3: Gummidichtung und 4: Kanal zum Gasaustritt; 5: Plexiglasstempel mit Innenbohrung für 6: Messingstöpsel zum Verschließen der Bodenöffnung; 7: gegossener Agarmantel

Kanülen: Zur nachträglichen Beimpfung des Mediums oder zum Durchleiten von Gasen können Kanülen durch die Mittelbohrung des Gestänges in die Kammern eingeführt werden. Ernährungsonden der Firma BRAUN / Melsungen mit 1,5 x 2,1 mm Durchmesser und einem Kunststoffansatz am oberen Ende haben sich am besten bewährt. Vor dem Versuch werden die Kanülen gereinigt und sterilisiert, indem sie zunächst mit Wasser und dann mit Alkohol ausgewaschen werden.

5.9 Belüftung

Bei geringer Gasentnahme zeigt der Luftstrom einer Gasflasche starke Schwankungen. Wegen dieser Schwankungen und den aus ihnen resultierenden Abweichungen des Kalorimeterrausschlages wurde bisher auf eine Belüftung innerhalb des Kalorimeters verzichtet.

Nach der Beimpfung des Mediums werden Kammer und die mit Puffer gefüllte Gegenkammer in einem umgebauten Reagenzglasthermostaten der Firma B. LANGE / Berlin auf die gewünschte Temperatur gebracht. Dabei sind die Kammern mit dem Gestänge soweit verschraubt, daß ein kleiner Abstand zwischen dem oberen Rand der Kammer und der Andruckfläche des Teflon-Stutzens bleibt. Der Stutzen trägt eine Bohrung, durch die das Gas aus der Kammer entweichen kann (s. Abb. 9).

Sauerstoff oder Stickstoff werden durch eine Waschflasche, einen Wattefilter und die Kanüle (s. 5.8) 20 Minuten lang in die Kammerflüssigkeit (beimpftes Medium bzw. Puffer) eingeleitet. Dann werden Kanüle und Kammer verschlossen und mit dem Gestänge ins Kalorimeter eingeführt.

Da das über dem Medium verbleibende Volumen (ca. 5 ml) klein ist, erreicht man durch Übersichten mit Stickstoff zwar anaerobes, doch mit Sauerstoff kein vollständig aerobes Wachstum.

In 10 ml des Minimalmediums 4/4 sind $0,34 \cdot 10^{-3}$ Mol Glucose enthalten, die zur vollständigen Veratmung $6,0,34 \cdot 10^{-3} = 2 \cdot 10^{-3}$ Mol O_2 entsprechend 50 ml O_2 (bei $30^\circ C$) benötigen. Aus dem Gesamtvolumen der Kammer (15 ml) läßt sich also abschätzen, daß bei vollständigem Sauerstoffverbrauch die Glucose von 2,5 ml Medium vergoren werden könnte.

5.10 Bestrahlungsanlagen

UV-Quelle: Bestrahlt wird mit einem OSRAM Entkeimungsstrahler HNS 12 (Quecksilber-Niederdruckstrahler). Rund 78 % der gesamten Strahlungsdichte fallen in die Linie 254 nm, 9 % in die Linie 185 nm, der Rest auf Linien im höheren Wellenlängenbereich. Die HNS 12 befindet sich in einem zylindrischen Metallmantel mit einer verschließbaren kreisförmigen Öffnung von 3 cm Durchmesser.

Bei einem Bestrahlungsabstand von 42 cm errechnet sich aus der Dosisleistungs-
dichte $1,9 \cdot 10^3 \text{ erg/s.cm}^2$ in der Linie 254 nm oder $2,4 \cdot 10^3 \text{ erg/s.cm}^2$ insgesamt für
die unten beschriebenen Bestrahlungsschälchen eine Oberflächendosisleistung von

$$1,2 \cdot 10^4 \text{ erg / s}$$

in der Linie 254 nm.

Röntgen-Quelle: Die Röntgenbestrahlung wird mit einem DERMOVOLT (S) der
Firma R. SEIFERT/Hamburg durchgeführt. Der DERMOVOLT enthält eine Machlett
OEG-60 Röhre mit axialem Strahlenaustritt und 1 mm Beryllium-Eigenfilterung. Die
Röhre ist maximal mit einer Spannung von 60 kV und 20 mA Röhrenstrom zu benutzen.

In den wiedergegebenen Versuchen wurde stets mit der Einstellung 50 kV/9 mA ge-
arbeitet, der eine Dosisleistung von 3,3 krad/min. entspricht. Nach Messungen
von SEIDEL (1959) beträgt die Grenzwellenlänge $0,25 \text{ \AA}$ ($\hat{=}$ 50 keV), das Maximum
der Energieabgabe liegt bei $0,48 \text{ \AA}$ ($\hat{=}$ 26 keV); bei $1,12 \text{ \AA}$ ($\hat{=}$ 11 keV) sind etwa
noch 10 % der Energie des Maximums zu beobachten.

Bestrahlungsschälchen: Während der Bestrahlung befindet sich die magnetisch ge-
rührte Suspension in einem Glasschälchen mit 2,7 cm Durchmesser ($\hat{=}$ 6,2 cm² Flä-
che). Bei 2 ml Suspension ergibt sich daraus eine Schichtdicke von 0,3 cm. Um
keine Abschattungseffekte zu erhalten, wird bei UV-Bestrahlung ein Titer von 10^6
bis 10^7 Zellen pro 0,1 ml nicht überschritten.

6. BIOLOGISCHES MATERIAL

=====

6.1 Stämme

Alle Untersuchungen wurden mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durch-
geführt.

Für die meisten Experimente (Proportionalität zwischen Energieabgabe und Wachs-
tum, Temperaturabhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit, Kultur auf Agarme-
dium usw.) wurde ein homozygoter diploider Stamm mit der Instituts-Bezeichnung
211 benutzt ⁹⁾, der keine Bedürftigkeiten zeigt und auch in Minimalmedium

9) s.z.B. LASKOWSKI (1960, 1962)

gut wächst. Sein Vorteil gegenüber anderen Stämmen ist, daß er wenig Klumpen bildet, welche die Bestimmung des Zelltiters erschweren. Sein gutes Wachstum in Minimalmedium macht es möglich, den Übergang von Minimalmedium zu Vollmedium (s. 7.8) zu untersuchen.

Bei der Ermittlung des Einflusses von UV- bzw. Röntgenstrahlen auf das Wachstum erwiesen sich die Stämme S 21 und S 16 in ihrer Strahlenempfindlichkeit als besonders geeignet. Diese beiden Stämme sind von AVERBECK (LASKOWSKI und AVERBECK 1968) aus dem Stamm 211 - 1 aM entwickelt worden. S 16 ist gegen Röntgenstrahlen, S 21 sehr stark gegen UV empfindlich. Ihr Ploidiegrad ist noch nicht ganz geklärt. Obwohl die Stämme biologisch nicht eindeutig definiert sind, wurden sie ihrer großen Strahlenempfindlichkeit wegen für diese Untersuchungen verwendet.

6.2 Vorkulturbedingungen

Der Stamm 211 wurde stets in flüssigem Minimalmedium der Zusammensetzung

12 g Glucose
4 g Yeast Nitrogen Base without amino acids¹ / 600 ml

bei 30° C auf einem mechanischen Schüttler angezogen.

Der haploide Stamm 211-1 aM und seine Abkömmlinge S 16 und S 21 wachsen nicht in Minimalmedium. Sie wurden deshalb in flüssigem Vollmedium oder auf Schrägagar bei 30° C vorkultiviert. Schrägagar hat den Vorteil, daß die Zellen weniger Klumpen als in flüssigem Medium bilden.

Die für Experimente benutzten Vorkulturen waren 48 Stunden alt, die Zellen befanden sich einige Zeit in der stationären Phase, ohne ausgehungert zu sein.

Vor der weiteren Verwendung wurden die Zellen aus dem Medium abzentrifugiert (bzw. mit Puffer vom Schrägagar abgewaschen und dann zentrifugiert), dreimal mit Puffer gewaschen und mit soviel ml Puffer aufgenommen, daß sich der gewünschte Titer ergab. Für Bestrahlungsversuche (mit anschließendem Ausplatten auf festem Vollmedium parallel zum Wachstum im Kalorimeter) erwies es sich als günstig, die Zellen durch kurzes Zentrifugieren bei 1.500 Umdrehungen/Minute zu fraktionieren, so daß man im wesentlichen mit Einzelzellen weiterarbeiten konnte.

6.3 Form der Beimpfung

Gegenüber dem anfänglichen Verfahren, nach Temperieren der Kammern im Kalorimeter das Inokulat durch eine Kanüle von außen zuzuführen, hat es sich bewährt, die Beimpfung außerhalb des Kalorimeters vorzunehmen und die Kammern nach Vortemperierung im Reagenzglasthermostaten in das Kalorimeter zu verbringen. Auch bei vorsichtigem Einführen der Kammern tritt eine Reibungswärme auf, die in 15 bis 30 Minuten an den Thermostatenblock des Kalorimeters abgegeben wird. Man muß also den Anfangstiter so wählen, daß in dieser Zeit die Wärmeabgabe biologischer Vorgänge unter der Nachweisgrenze des Kalorimeters bleibt.

In Minimalmedium beträgt die durchschnittliche Energieerzeugung pro Zelle etwa $2 \cdot 10^{-8}$ cal, d.h. bei einer Generationsdauer von 2 Stunden $1 \cdot 10^{-8}$ cal/h.Zelle. Soll der Anfangsausschlag bei der geringsten Empfindlichkeit der Anzeige (ohne Reduziervorsatz, s. 5.3) nicht größer als 3 mm sein, so erhält man einen zulässigen Titer von rund $3 \cdot 10^6$ Zellen. Bei der Beurteilung von Kalorimeterkurven bzw. deren durch Integration gewonnenen Stammfunktionen muß man also darauf achten, ob es sich im Anfangsstadium um eine biologische lag-Phase oder um eine "lag-Phase" des Instrumentes, d.h. eine zu geringe Anzeigeempfindlichkeit des Nachweissystems, handelt.

Bei flüssigem Medium werden 0,5 oder 1,0 ml Suspension mit entsprechend eingestelltem Titer in 9,5 oder 9,0 ml Medium einpipettiert, so daß sich insgesamt 10 ml Flüssigkeit in der Kammer befinden. Bei Wachstum auf Agarmedium (s. 7.9) werden 0,1 ml Suspension durch Drehen der horizontal liegenden Kammer um die Zylinderachse auf der Agaroberfläche verteilt.

6.4 Medien

Für die beschriebenen Versuche wurden im wesentlichen drei verschiedene Wachstums-Medien und Glucose-Puffer benutzt.

6.4.1 Minimalmedium

Als normales Medium einfacher Zusammensetzung, in dem der Stamm 211 gut wächst,

diente ein Minimalmedium 4/4 mit Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle und Difco "Yeast-Nitrogen-Base without amino acids" (YNB) als Stickstoffquelle. In den Versuchen 7.4 bis 7.6 und 7.13 betrug die Glucose-Konzentration $34 \mu\text{Mol/ml}$ bei $6,7 \text{ mg YNB/ml}$. In 7.7 wurde die YNB-Konzentration konstant gehalten und die Glucose-Konzentration zwischen $4,2$ und $270 \mu\text{Mol/ml}$ variiert.

6.4.2 Vollmedium:

Die Stämme 211-1aM, S 16 und S 21 (s. 6.1) wachsen nicht in Minimalmedium. Deshalb wurde für die Versuche 7.11 ein Vollmedium benutzt, das 2 % Glucose ($\approx 101 \mu\text{Mol/ml}$), 1 % Difco Yeast-Extrakt und 0,5 % Pepton enthält, d.h. den Zellen alle Aminosäuren bietet.

6.4.3 Variiertes Vollmedium:

Für die Versuche 7.8 mußte ein etwas variiertes Vollmedium verwendet werden, das bei gleicher Glucose-Konzentration wie oben ($101 \mu\text{Mol/ml}$) $6,7 \text{ mg YNB/ml}$ enthielt und dessen Yeast-Extrakt-Komponente von 0 bis 10 mg/ml variierte.

6.4.4 Agarmedium:

Das Medium der Versuche 7.9 entsprach einem Minimalmedium 4/4 ($34 \mu\text{Mol Glucose}$ und $6,7 \text{ mg YNB/ml}$), dem 2 % Agar zugesetzt wurde.

6.4.5 Glucose-Puffer:

Für die Untersuchung des Betriebsstoffwechsels 7.10 und 7.12 (kein Wachstum) wurde ein Glucose-Puffer mit $101 \mu\text{Mol Glucose/ml}$ KH_2PO_4 -Puffer benutzt.

7. VERSUCHSABLAUF UND ERGEBNISSE

7.1 Kurze Zusammenfassung des Versuchsablaufes

- 1) Vorbereitung der Zellen: Abzentrifugieren, dreimaliges Waschen, Einstellen des gewünschten Titers (evtl. UV- oder Röntgenbestrahlung der Zellen).

- 2) Beschicken der mit Alkohol ausgewaschenen und ausgeflamten Stahlkammern mit Medium oder Puffer und anschließendes Beipfen.
- 3) 20 Minuten lang Vortemperieren auf die Kalorimetertemperatur und gleichzeitiges Durchleiten von Stickstoff oder Sauerstoff.
- 4) Einführen der Kammern in das 2 Stunden vorher auf die gewünschte Temperatur gebrachte Kalorimeter, Einschalten der Folgeschreiber und Aufzeichnen der Null-Linien der Galvanometersysteme.
- 5) Nach einer halben Stunde bis Stunde Einstellen der gewünschten Anzeigeempfindlichkeit am Kalorimeter und am Galvanometer-Reduziervorsatz. Aufzeichnen der Wachstumskurven.
- 6) Nach Rückkehr des Galvanometerausschalges auf etwa Null am Ende des Versuches neuerliches Aufzeichnen der Null-Linie zur Kontrolle.
- 7) Ermitteln der Fläche zwischen Null-Linie und Kurve mit einem Kompensationsplanimeter, mit Integratoren oder durch Auszählen.
- 8) Bestimmen des Zellendtiters.

7.2 Eichung der Apparatur

Aus der Anzahl der Thermoelemente, der Kombination der gewählten Metalle und den charakteristischen Daten der Galvanometer kann man den pro mW sekundlich freigesetzter Wärme zu erwartenden Ausschlag des Galvanometers in cm berechnen.

Eine genaue Eichung ist z.B. über den Joule-Effekt, die bekannte Lösungs- oder Neutralisationswärme eines Stoffes oder den radioaktiven Zerfall eines mit anderen Mitteln genau vermessenen Strahlers zu gewinnen (BOIVINET 1964). Ebenso ist eine Eichung mit Hilfe des Peltier-Effektes (CALVET und DUQUESNE 1964) oder des Joule-Effektes in den Thermosäulen des Nachweissystemes (PRUNIER und COTEN 1967) durchführbar.

Aus praktischen Gründen wurde nur der Joule-Effekt zur Eichung des Kalorimeters

verwandt. Von einem hochkonstanten Spannungsnormals SN3 der Firma WANDEL & GOLTERMANN / Reutlingen wurde über einen Spannungsteiler eine variable Spannung zwischen 0,1 und 1,5 Volt an einen $1.000\ \Omega$ -Widerstand in einer Kalorimeterkammer gelegt. Dieser Drahtwiderstand, auf Keramik gewickelt, tauchte in Silikonöl ein, das für eine gute Wärmeleitung vom Widerstand zur Kammerwandung sorgte. Spannung am und Strom durch den Widerstand wurden mit 2 Siemens-Präzisions-Zeigerinstrumenten der Klasse 0,2 gemessen.

Trägt man den bei verschiedenen Spannungen erhaltenen Galvanometerausgang (etwa in cm Auslenkung des Nachlaufschreibers) als Funktion der im stationären Zustand abgegebenen Jouleschen Leistung (in mW) auf, so erhält man für jede Kalorimeterempfindlichkeit eine Gerade, deren Steigung den Eichfaktor in cm/mW gibt (s. Abb. 10).

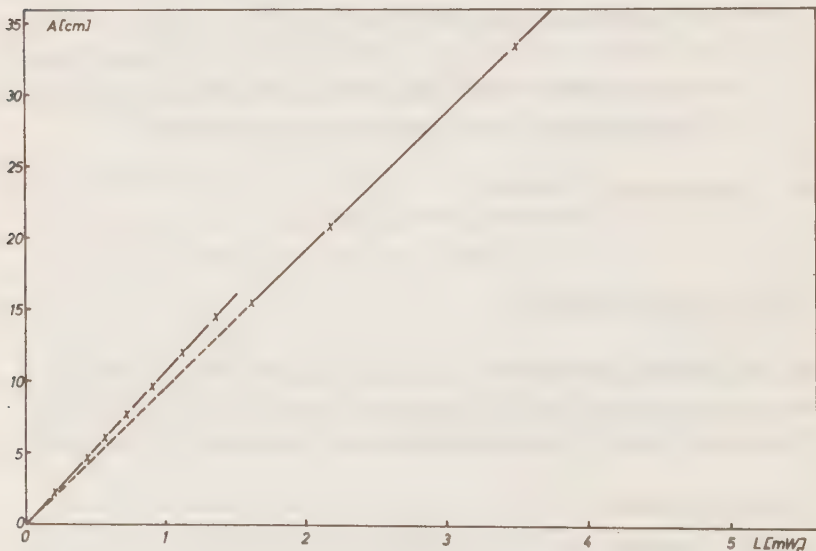


Abb. 10

Eichgerade für die Kalorimeteranzeige. Ordinate: Ausschlag des Anzeigesystems in cm; Abszisse: als Joulesche Wärme abgegebene Leistung in mW.

Die linke steilere Gerade entspricht einer Anzeigeempfindlichkeit "PS", die rechte "1/10 PS". Der Faktor 1/10 wird nicht genau erreicht, der Fehler beträgt 10 %.

Die Eichfaktoren sind für beide Diagonalen etwas verschieden (s. Tab. 3, vergl. auch Tab. 2). Ebenso entsprechen die Empfindlichkeitsquotienten Q nicht dem vom Hersteller angegebenen Verhältnis der Säulenelemente 1 : 3 : 4. Eine Abweichung von 10 % zeigt sich bei der Reduzierung der Galvanometerempfindlichkeit um den Faktor 10 (s. Abb. 10), jedoch nicht bei der um den Faktor 3. Insgesamt ergeben sich für die beiden Diagonalen D 1 und D 2 und die drei Empfindlichkeitsstufen "PS", "MS" und "GS" die in Tabelle 3 zusammengestellten Werte.

Tabelle 3

ANZEIGEEMPFINDLICHKEIT DES MIKROKALORIMETERS
E. CALVET

	D 1			D 2		
	cm/mW	W/cm	Q	cm/mW	W/cm	Q
"PS"	10,6	94,0	1	9,8	102,0	1
"MS"	22,4	44,7	2,1	21,9	45,6	2,2
"GS"	26,5	37,7	2,5	25,4	39,3	2,6

Der Fehler in der Reproduzierbarkeit einer Wärmemessung, d.h. des Zeitintegrals über den Wärmefluß, beträgt etwa 1 %. Er wird im wesentlichen durch die Ungenauigkeit in der Ermittlung der Fläche zwischen Kurve und Null-Linie bedingt.

7.3 Rühren und Belüften des Mediums

Soll eine Zellkultur unter aeroben Bedingungen aufwachsen, so wird sie geschüttelt oder gerührt, in erster Linie, um eine möglichst weitgehende Sättigung der Lösung mit Sauerstoff zu erreichen, in zweiter Linie, um die Zellen besser mit Nährstoffen zu versorgen. Bei solchem rein mechanischen oder magnetisch-mechanischen Rühren tritt im Medium eine Reibungswärme auf, die größer als die zu messenden kalorischen Effekte sein kann ¹⁰⁾.

10) LEYDET (1966) beschreibt eine Vorrichtung zum Rühren, die aus einem Elektromagneten besteht, der in variablen Zeitabständen eine Achse mit horizontalen Lamellen ein definiertes Stück in der Flüssigkeit der Kalorimeterkammer hebt. Bei 8 Impulsen pro Minute beträgt die Rührwärme 0,02 cal/h.

Es war daher die Frage zu klären, ob es möglich ist, bei (anaerobem) Wachstum unter Stickstoff auf das Rühren zu verzichten.

Zur Prüfung wurden zylindrische Glaskammern verwendet, die mit 1,5 cm Durchmesser und 7,5 cm Höhe dieselben Maße wie die Kalorimeterkammern haben und ebenfalls das Durchperlen von Gas ermöglichen. Nach dem Beimpfen wurden die Glaskammern verschlossen und in einem Thermostatenbad 20 Minuten von Stickstoff durchströmt. In bestimmten Wachstumsphasen wurde der Inhalt je einer Kammer magnetisch gerührt, ohne sie zu öffnen. Nach 48 Stunden war das Wachstum zu Ende, und der Zelltiter konnte durch Auszählen ermittelt werden. Es zeigt sich kein Unterschied im Zellendtiter zwischen den einzelnen Kammern. Das ist verständlich, da bei Glucose als wachstumsbegrenzendem Faktor stets gleiche Mengen Zellmaterial gebildet werden sollten. Allerdings nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in einem nichtgerührten Medium ab. Dadurch wird es auch unmöglich, parallel zu den Thermogrammen außerhalb des Kalorimeters zum Vergleich Wachstumskurven durch eine kontinuierliche Trübungsmessung aufzuzeichnen, weil diese ein ständiges Rühren verlangt und dadurch die Geschwindigkeit verändert. Andererseits beobachteten SENEZ und BELAICH (1965) beim anaeroben Wachstum von *Pseudomonas lindneri* in gerührtem und ungerührtem Medium keinen Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit.

BATTLE (1960) findet in seinem Kalorimeter mit Rühren eine geringere Gesamtwachstumswärme als ohne Rühren. Er führt den Unterschied darauf zurück, daß durch Rühren das gebildete Kohlendioxid an die Atmosphäre über der Flüssigkeit abgegeben wird und nicht wie ohne Rühren gelöst bleibt. Außerdem tritt eine stärkere Verdampfung des entstandenen Alkohols auf. Beide Effekte sind mit einer Abkühlung des Systems verbunden.

7.4 Energieabgabe und Glucoseverbrauch

Um den Zusammenhang zwischen Energieabgabe, Glucoseverbrauch und Zunahme des Zelltiters zu prüfen, wurde parallel zu Kalorimeterversuchen das Wachstum

-
- 10) LEYDET (1966) beschreibt eine Vorrichtung zum Rühren, die aus einem Elektromagneten besteht, der in variablen Zeitabständen eine Achse mit horizontalen Lamellen ein definiertes Stück in der Flüssigkeit der Kalorimeterkammer hebt. Bei 8 Impulsen pro Minute beträgt die Rührwärme 0,02 cal/h.

von Hefezellen in Glaskammern durch Auszählen verfolgt (Glaskammern und Versuchsführung wie unter 7.3 beschrieben). Die 12 Glaskammern befanden sich in einem Wasserbadthermostaten, dessen Temperatur weniger als $\pm 0,1^\circ \text{C}$ schwankte. Zu bestimmten Zeiten wurde eine der Kammern geöffnet, der Titer ermittelt und die Suspension für den Glucosetest vorbereitet.

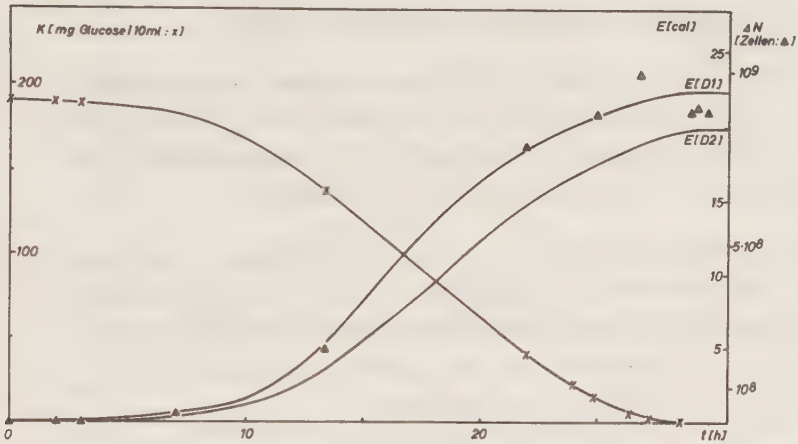


Abb. 11 Glucose-Konzentration; K , Wärmeabgabe in der Kalorimeter-Diagonalen D1; $E(D1)$ und in der Diagonalen D2; $E(D2)$ und Zellzunahme ΔN als Funktion der Zeit t . Δ stellt im Gegensatz zu $\blacktriangle$ einen Mittelwert für mehrere Kammern dar.

Die Ermittlung der Glucose-Konzentration erfolgte durch Extinktionsmessung in einem Beckman-Spektralphotometer unter Verwendung der Biochemica Test-Kombinationen "Toluidin" und "o-Dianisidin" der Firma BOEHRINGER / Mannheim. Die vom Kalorimeter aufgezeichneten Kurven für die beiden Diagonalen D1 und D 2 wurden numerisch integriert ($\int E(D1)$ und $\int E(D2)$) und zusammen mit den zu bestimmten Zeiten gewonnenen Zelltitern ΔN und den photometrisch ermittelten Glucose-Konzentration K über der Zeit aufgetragen (Abb. 11).

Man findet eine gute Proportionalität zwischen der Glucoseabnahme, der Zunahme des Zelltiters und der integrierten Energieabgabe des Systems ¹¹⁾.

11) SENEZ und BELAICH (1965) beobachteten beim Wachstum von *P. lindneri* ebenfalls eine Parallelität zwischen der kolorimetrisch gemessenen Trübung und der integrierten Kalorimeter-Kurve.

Mittelt man über die Meßwerte für K und E (D1) und E (D2), so findet man einen Umwandlungsquotienten

$$q = 21,5 \text{ kcal / Mol Glucose}$$

mit einem Fehler von $\pm 5\%$. Dieses Ergebnis entspricht dem Wert, den man aus der Abhängigkeit der Energieabgabe von der Glucose-Konzentration erhält (§.8.3).

7.5 Abhängigkeit der maximalen Wärmeabgabe vom Zelliter

Nach dem logistischen Ansatz (§. A1) zur Beschreibung der Wachstumsvorgänge ist an der Stelle des größten Wachstums der halbe Zellenditer $N_{\infty}/2$ erreicht. Dem stärksten Wachstum entspricht das Maximum $\overset{\circ}{E}_{\max}$ der Kalorimeteranzeige. Es ist daher sinnvoll, $\overset{\circ}{E}_{\max}$ als Funktion von $N_{\infty}/2$ zu untersuchen.

Unter 7.7 werden der Enditer N_{∞} und der maximale Ausschlag $\overset{\circ}{E}_{\max}$ als Funktion der Glucose-Konzentration K_o angegeben. Löst man $N_{\infty} = N_{\infty}(K_o)$ (Gleichung (17)) nach K_o auf und setzt die gewonnene Umkehrfunktion $K_o = K_o(N_{\infty})$ in $\overset{\circ}{E}_{\max} = \overset{\circ}{E}_{\max}(K_o)$ (Gleichung (20)) ein, so erhält man näherungsweise für $\overset{\circ}{E}_{\max} = \overset{\circ}{E}_{\max}(N_{\infty}/2)$ die nach oben geöffnete Parabel

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)_{\max} = \overset{\circ}{E}_{\max} = 0,35 \cdot 10^{-16} (N_{\infty}/2)^2 \text{ cal/h.} \quad (9)$$

Sie beschreibt den Bereich $0 \leq N_{\infty}/2 \leq 0,7 \cdot 10^8$ gut und geht bei $N_{\infty}/2 = 0,7 \cdot 10^8$ in die Interpolationsgerade ¹²⁾ über, die man durch Regressionsanalyse findet:

$$\overset{\circ}{E}_{\max} = 0,55 \cdot 10^{-8} (N_{\infty}/2) - 0,22 \text{ cal/h} \quad (10)$$

(vgl. Abb. 12).

7.6 Wärmeentwicklung und Zunahme der Zellzahl

In einer Reihe von Experimenten wurde das Wachstum bei verschiedenen Kalorimeteranzeigen abgebrochen und die Zunahme der Zellzahl ΔN sowie die insgesamt abgegebene Wärme E ermittelt. (s. Abb. 13).

12) (10) ist aus (9) abzuleiten, wenn man den einen Faktor $N_{\infty}/2$ in (9) durch den Mittelwert $1,6 \cdot 10^8$ des betrachteten Intervalls $0,7 \cdot 10^8 \leq N_{\infty}/2 \leq 2,5 \cdot 10^8$ ersetzt.

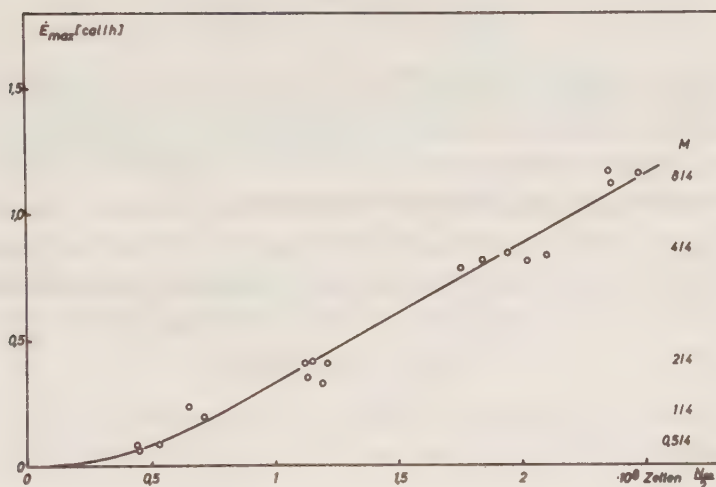


Abb. 12 Maximalausschlag $\dot{E}_{\max}$ als Funktion des halben Zellentiters $N_{\infty}/2$. Die Zahlen am rechten Rand geben das Medium an, für das die Meßpunkte gewonnen wurden.

Bei diesen Versuchen befand sich das Medium entweder unter Stickstoff oder unter Sauerstoff. Innerhalb der Fehlergrenzen ergibt sich für beide Gasarten derselbe lineare Zusammenhang zwischen der Zunahme des Zelltiters ΔN und der Wärmeentwicklung $\dot{E}$:

$$\dot{E} = 2,2 \cdot 10^{-8} \cdot \Delta N - 0,2 \quad \text{cal, } s = \pm 1,0 \quad (11)$$

(s = Standardabweichung). Der Ordinatenabschnitt liegt innerhalb des Fehlerbereiches, d.h. die Gerade geht erwartungsgemäß durch den Ursprung. Eine wesentlich geringere, auf den endogenen Stoffwechsel zurückzuführende Wärmeabgabe ist auch bei $\Delta N = 0$ vorhanden, doch kann sie bei dieser Versuchsführung nicht beobachtet werden (s. aber 7.7 und 8.4).

Dividiert man jeden einzelnen E-Wert durch den zugehörigen Zuwachs ΔN , so ergibt sich die Wärmeerzeugung e pro Zelle, im Mittel:

$$e = (2,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-8} \text{ cal / Zelle.} \quad (12)$$

Das Ergebnis bestätigt die Erwartung, daß bei dieser Untersuchungsmethode in der Anfangsphase des Wachstums (genügendes Glucoseangebot) kein Unterschied zwischen Wachstum unter Stickstoff oder unter Sauerstoff zu beobachten ist, da zunächst Glucose vergoren und erst später Alkohol veratmet wird.

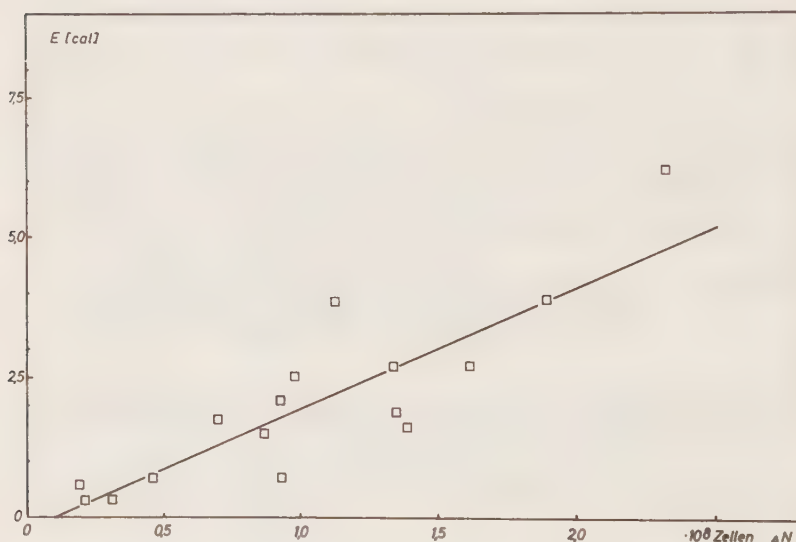


Abb. 13 Zusammenhang zwischen der insgesamt abgegebenen Wärme E und dem gleichzeitigen Zellzuwachs ΔN .

Wie unter 7.3 gezeigt wurde, ist es schwer möglich, im Mikrokalorimeter aerobes Wachstum zu erreichen. Erst bei ständigem Rühren oder Durchperlen von Gas sollten signifikante Unterschiede für die Energieabgabe pro Zelle unter Stickstoff oder Sauerstoff auftreten.

7.7 Wachstumswärme als Funktion der Glucose-Konzentration des Mediums

Für *S. lactis* (BOIVINET 1964) und *P. lindneri* (SENEZ und BELAICH 1965 und BELAICH 1963) wurde nachgewiesen, daß die beim Wachstum entwickelte Wärme proportional zur Konzentration K_0 der Kohlenstoffquelle im Medium ist. Es war daher zu prüfen, ob *S. cerevisiae* ein entsprechendes Verhalten zeigt. Ein erster Hinweis darauf findet sich bei HILL (1911).

Die Kalorimeterkammern wurden mit 9,5 ml eines Minimalmediums gefüllt, dessen Glucose-Konzentration K_0 zwischen 0,5 und 32 g pro 600 ml variierte, dessen andere Bestandteile aber konstant blieben. Die in den Abb. 15 bis 19, 31 und 32 auf der Abszisse angegebenen "rel. Einheiten" entsprechen

0,084 mMol Glucose pro 10ml.

Bis zu einer Glucose-Konzentration $K_0 = 24$ folgen die Wachstumskurven stets dem logistischen Ansatz (Abb. 14, 33 und 34), während bei $K_0 = 32$ der Kurvenverlauf

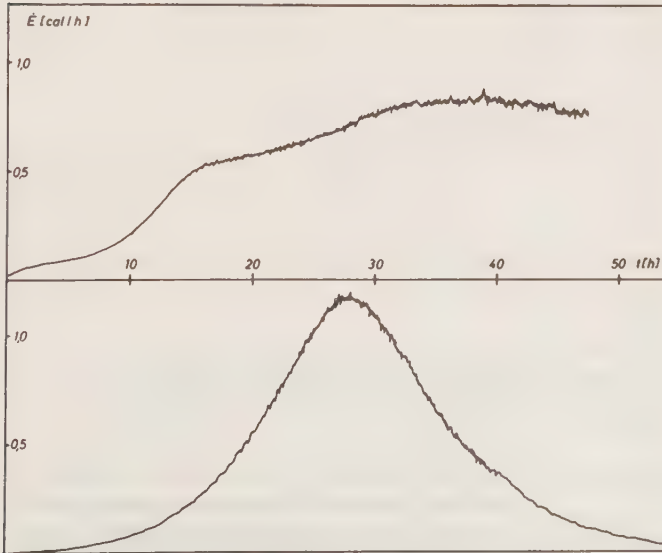


Abb. 14 Vergleich der Wachstumskurven bei einer Glucose-Konzentration $K_0 = 32$ (oben) und $K_0 = 24$ (unten).

manchmal verändert ist (Abb. 14 oben) und sich aus mehreren Teilen superponiert ¹³⁾.

Für den untersuchten Konzentrationsbereich findet man einen streng linearen Zusammenhang zwischen der insgesamt abgegebenen Wärme E und der Glucose-Konzentration K_0 (s. Abb. 15):

$$E = 1,87 \cdot K_0 + 0,97 \text{ cal} \quad (13)$$

mit einem Regressionskoeffizienten $r = +0,99$ und der Standardabweichung $s = \pm 1,62$. Der Ordinatenabschnitt "0,97" liegt innerhalb des Fehlerbereiches und kann damit plausibel als Null angenommen werden. Denn (a) ist Glucose die einzige Energiequelle im Minimalmedium und (b) muß die Kurve des Zellwachses als Funktion der Glucose-Konzentration $N_\infty = N_\infty(K_0)$ (s. Gl. (17)) durch Null gehen, da

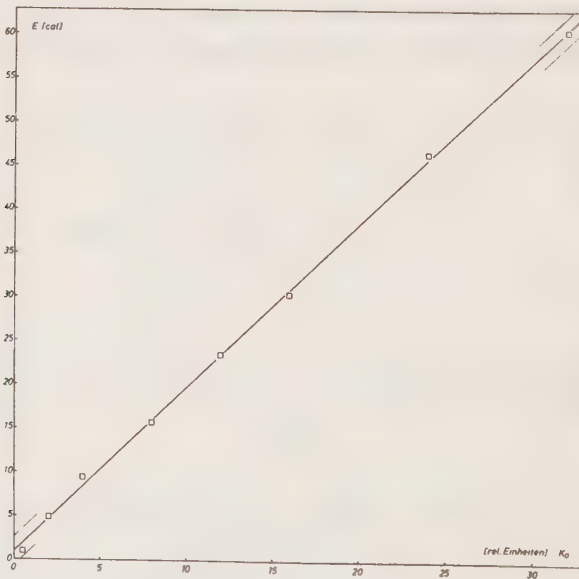


Abb. 15

Abhängigkeit der beim Wachstum abgegebenen Wärme E von der Glucose-Konzentration K_0 . Das 95 %-Mutungsintervall ist angedeutet. 1 rel. Einheit = 0,084 mMol/10 ml.

13) Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch BELAICH und SENEZ (1967) für glucose-begrenztes Wachstum von *P. lindneri*.

bei $K_0 = 0$ kein Wachstum zu beobachten ist¹⁴⁾. Dividiert man die abgegebene Wärme E durch den Zellendtitel N_∞ , so ergibt sich die pro Zelle freigesetzte Energie e als Funktion von K_0

$$e = (0,36 \cdot K_0 + 1,10) \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle} \quad (14)$$

mit einer Standardabweichung $s = \pm 1,79$ und einem Regressionskoeffizienten $r = +0,91$. Würde man auch hier den Ordinatenabschnitt gleich Null setzen, so würde aus

$$e = E/N_\infty$$

$$N_\infty = E/e = \text{const.}$$

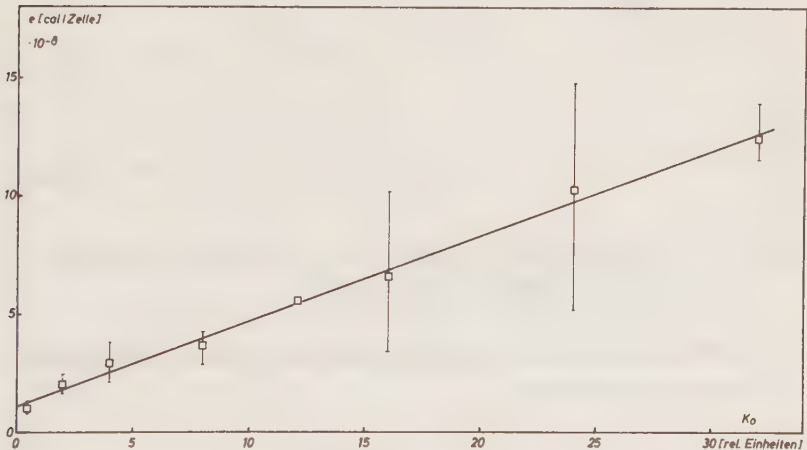


Abb. 16 Pro Zelle abgegebene Energie e als Funktion der Glucose-Konzentration K_0 . Die Streuungen um den Mittelwert sind eingetragen. 1 rel. Einheit = 0,084 mMol/10 ml¹⁵⁾.

- 14) Analoge Untersuchungen von BOIVINET (1964) an *S. lactis* bringen entsprechende Resultate.
- 15) Der Zellendtitel N_∞ und die durch Division mit N_∞ gefundenen Werte (e und $\bar{e}$, s. Abb. 16, 17, 18) zeigen besonders starke Schwankungen, da die Zellgröße von Versuch zu Versuch variiert. Das Produkt Zellzahl $\times$ Zellgröße = gebildete Zellmasse sollte geringere Streuungen ergeben.

folgen, was mit den experimentellen Ergebnissen nicht übereinstimmt (s. Abb. 17). Außerdem findet man bei $K_0 = 0$ einen endogenen Stoffwechsel entsprechender Größe, der aber bei einem Anfangstitern von $3 \cdot 10^6$ Zellen so wenig zur Gesamtwärme E beiträgt, daß er zu vernachlässigen ist.

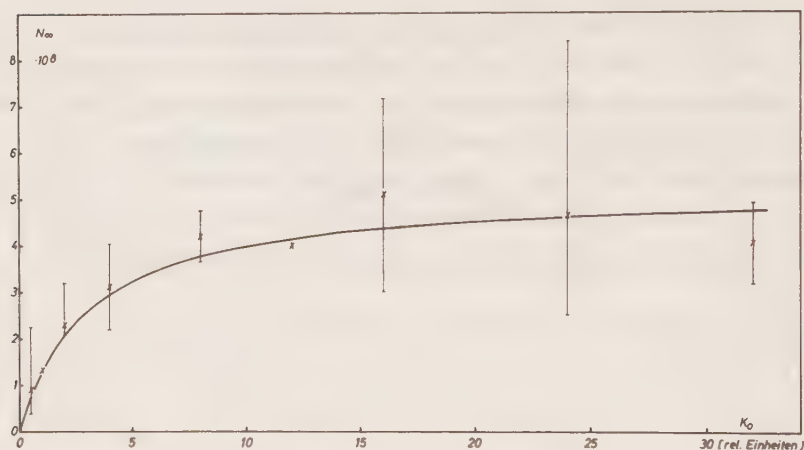


Abb. 17 Abhängigkeit des Zellentiters N_{∞} von der Glucose-Konzentration K_0 . Alle Angaben wie bei Abb. 16.

Aus den Überlegungen für $E(K_0)$ und $e(K_0)$ folgt, daß N_{∞} durch eine hyperbolische Funktion mit dem Ansatz

$$N_{\infty} = \frac{E}{e} = \frac{\alpha \cdot K_0}{\beta \cdot K_0 + \gamma}$$

dargestellt werden kann. Diese Kurve geht durch den Nullpunkt, nähert sich einer zur Konzentrations-Achse parallelen Asymptote mit dem Wert

$$N_{\infty} = \alpha / \beta,$$

der für alle K_0 -Werte angenommen würde, wenn $\gamma = 0$ wäre (s.o.), und wächst für $\gamma \neq 0$ bei kleinen K_0 -Werten linear mit K_0 :

$$N_{\infty} = \alpha / \gamma \cdot K_0.$$

Mit den Geradengleichungen (13) und (14) wird

$$N_{\infty} = \frac{1,87 \cdot K_O}{0,36 \cdot K_O + 1,10} \cdot 10^8 \text{ Zellen.} \quad (17)$$

In Abb. 17 ist diese Kurve mit den experimentellen Ergebnissen verglichen¹⁵⁾.

Die Abhängigkeit des maximalen Ausschlages $\dot{E}_{\max}$ von der Glucose-Konzentration K_O läßt sich einfacher ermitteln, wenn man von $\dot{e}$, der maximalen Wärmeentwicklung pro Zelle ausgeht. $\dot{e} = \dot{e}(K_O)$ zeigt ein Sättigungsverhalten, das sich wieder durch einen hyperbolischen Ansatz beschreiben läßt:

$$\dot{e} = \frac{K_O + 0,335}{1,21 \cdot K_O + 3,35} \cdot 10^{-8} \text{ cal/h.Zelle}^{16)} \quad (18)$$

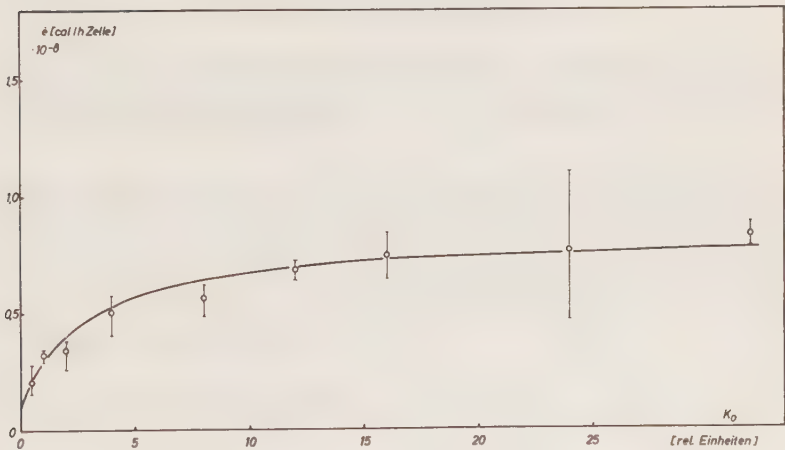


Abb. 18 Abhängigkeit der maximalen Wärmeentwicklung pro Zelle $\dot{e}$ von der Glucose-Konzentration K_O . Alle weiteren Angaben wie bei Abb. 16.

- 16) OHLMEYER und FRITZ (1966) geben für ein Medium mit 2 % Glucose (entsprechend 12 rel. Einheiten) einen Glucoseumsatz von $0,37 \cdot 10^{-12}$ Mol/h. Zelle an, während sich aus (18) $0,34 \cdot 10^{-12}$ Mol/h. Zelle errechnen.

Der positive Summand im Zähler deutet darauf hin, daß auch bei $K_0 = 0$ ein positiver Ausschlag

$$\dot{e} = 0,1 \cdot 10^{-8} \text{ cal/h. Zelle}$$

vorhanden ist, der auf einen endogenen Stoffwechsel zurückgeführt werden kann.

Faßt man die beiden Funktionen $\dot{e} = \dot{e}(K_0)$ und $N_\infty = N_\infty(K_0)$ zusammen und beachtet, daß nach dem logistischen Ansatz im Maximum der $\dot{E}$ -Kurve der halbe Zellendtitel erreicht ist, so findet man aus

$$\dot{E}_{\max}^0 = \frac{1}{2} N_\infty \cdot \dot{e} \quad (19)$$

die Abhängigkeit

$$\dot{E}_{\max}^0 = \frac{0,94 \cdot K_0^2 + 0,31 \cdot K_0}{0,44 \cdot K_0^2 + 2,54 \cdot K_0 + 3,69} \text{ cal/h,} \quad (20)$$

die in Abb. 19 dargestellt ist. Diese hyperbolische Kurve hat in $K_0 = 0$ eine Tangente positiver Steigung und nähert sich für wachsendes K_0 einer Asymptote mit

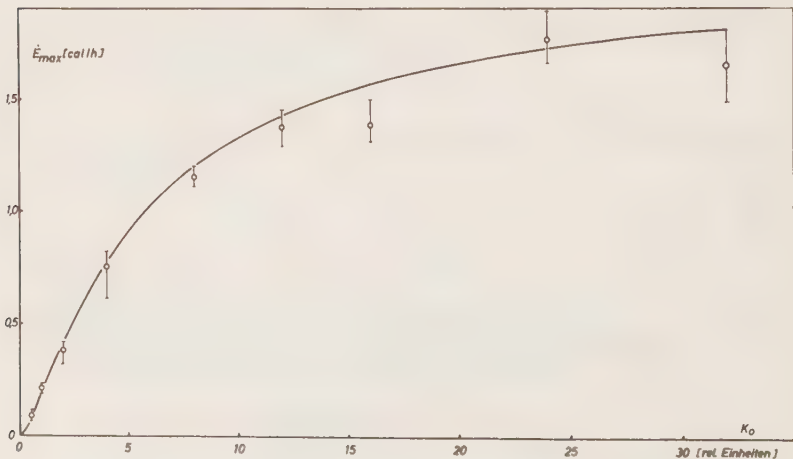


Abb. 19 Abhängigkeit der maximalen Wärmeentwicklung $\dot{E}_{\max}^0$ von der Glucose-Konzentration K_0 . Alle weiteren Angaben wie in Abb. 16.

dem Wert

$$E_{\max}^{\infty} = 2,13 \text{ cal/h.}$$

7.8 Übergang von Minimal- zu Vollmedium

Im allgemeinen besitzen Hefen die Fähigkeit, die als Proteinbausteine benötigten 20 Aminosäuren selber zu synthetisieren und dadurch auch in einem Medium zu wachsen, das ihnen außer einer Kohlenstoff- und einer Stickstoffquelle nur die verschiedenen Wirkstoffe und Mineralsalze bietet. Ein solches Medium ist das benutzte Minimalmedium

2 g Glucose, 0,67 g Yeast Nitrogen Base w.o. (ohne
Aminosäuren) pro 100 ml,

dem ein Vollmedium gegenübersteht, das zusätzlich noch

1 g Yeast Extract pro 100 ml

enthält, also auch Aminosäuren zur Verfügung stellt.

Es sollte geprüft werden, wie sich das Wachstum und die Energieerzeugung beim Übergang vom reinen Minimalmedium (0 %) zum Vollmedium (100 %) in Abhängigkeit vom Anteil des Vollmedium (x %) ändert. Durch die Zusammensetzung der beiden Medien ist gewährleistet, daß Glucose- und Stickstoffkonzentration für alle Mischungsverhältnisse konstant bleiben.

Bei jeder Vollmedium-Konzentration werden im Mittel

$$22,6 \pm 1,6 \text{ cal}$$

an den Thermostaten abgegeben.

Betrachtet man aber die spezielle Synthesleistung der Zellen, so treten die Unterschiede bei den verschiedenen Yeast-Extrakt-Konzentrationen deutlich hervor. Im Vollmedium wachsen rund dreimal soviel Zellen auf wie im Minimalmedium (Abb.20), was sich im Glucose-Verbrauch und in der Wärmeabgabe pro Zelle ausdrückt.

Tabelle 4

ENDTITER, GLUCOSE-VERBRAUCH UND WÄRMEABGABE PRO ZELLE IN MINIMAL- UND VOLLMEDIUM

	Zellen/10 ml	g Glucose/Zelle	cal/Zelle
Minimalmedium	$4,1 \cdot 10^8$	$4,63 \cdot 10^{-10}$	$5,5 \cdot 10^{-8}$
Vollmedium	$12,1 \cdot 10^8$	$1,58 \cdot 10^{-10}$	$1,9 \cdot 10^{-8}$

Die Glucose-Ausnutzung ist im Vollmedium also wesentlich besser als im Minimalmedium.

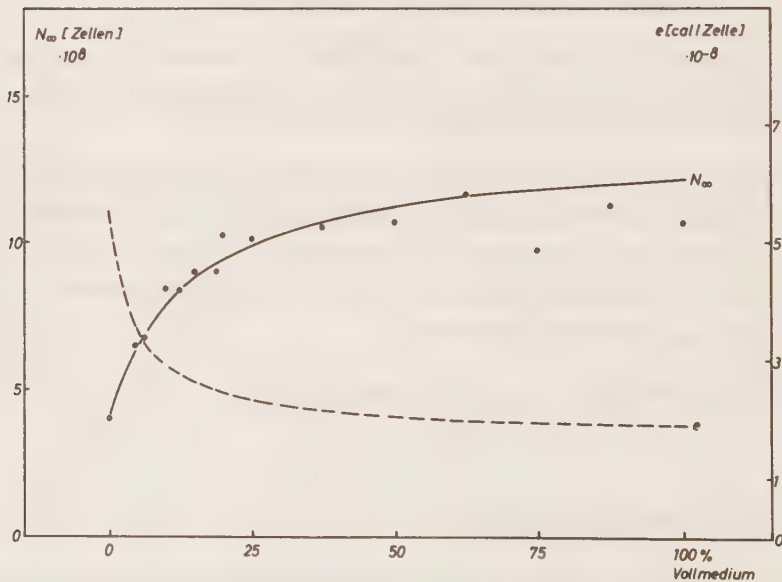


Abb. 20 Endtiter N_{∞} und Energie pro Zelle e als Funktion der Vollmedium-Konzentration.

Der Verlauf der N_{∞} -Kurve in Abb. 20 (Endtiter als Funktion der Aminosäuren-Konzentration) läßt sich durch den von MONOD (1942) angegebenen hyperbolischen Ansatz beschreiben. Die experimentellen Ergebnisse werden am besten durch die Funktion

$$N_{\infty} = 13,25 \cdot 10^8 \frac{K' + 4,4}{K' + 14,3} \quad \text{Zellen/10 ml} \quad (21)$$

(K' in % der Aminosäurenkonzentration im Vollmedium) wiedergegeben. Da die gesamte Wärme für alle Konzentrationen konstant

$$E = 22,6 \pm 1,6 \quad \text{cal}$$

ist, ergibt sich für die pro Zelle entwickelte Wärme $e = E/N_{\infty}$ der hyperbolische Abfall

$$e = 1,71 \cdot 10^{-8} \frac{K' + 14,3}{K' + 4,4} \quad \text{cal/Zelle.} \quad (22)$$

Der Maximalausschlag $\overset{\circ}{E}_{\max}$ zeigt stärkere Schwankungen um den Mittelwert

$$\overset{\circ}{E}_{\max} = 1,79 \pm 0,31 \quad \text{cal/h,}$$

ein Ansteigen mit wachsender Aminosäuren-Konzentration ist nicht signifikant.

Mit diesem konstanten Wert ergibt sich auch für die Wärmeerzeugung pro Zelle

$\overset{\circ}{e}_{\max}$ ein hyperbolischer Abfall entsprechend dem für e :

$$\overset{\circ}{e}_{\max} = 0,14 \cdot 10^{-8} \frac{K' + 14,3}{K' + 4,4} \quad \text{cal/h.Zelle.} \quad (23)$$

7.9 Energieabgabe beim Wachstum auf einem Agarmedium

Für viele Untersuchungen an Hefen (z.B. Strahlensensibilität, Bedürftigkeit, Temperatursensibilität usw.) eignet sich ein mit Agar verfestigtes Medium zur Kultur besonders gut. Die folgenden Untersuchungen galten der Frage, wie die Wärmeentwicklung beim Wachstum auf einem Agarmedium verläuft.

In 5.8 und Abb. 9 sind Plexiglasstempel beschrieben und dargestellt, mit deren Hilfe man an der Wandung der Kalorimeterkammer einen gleichmäßigen Agarmantel herstellen kann. Auf dieser Mediumschicht wurden zu Beginn des Versuches 0,1 ml

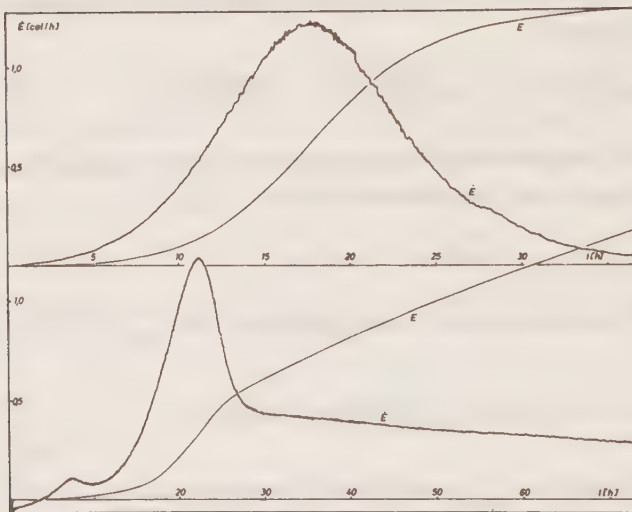


Abb. 21 Vergleich der Thermogramme beim Wachstum in flüssigem Medium (oben) und auf Agarmedium (unten). $\dot{E}$ stellt die vom Kalorimeter im Zeitpunkt t gemessene Wärmeerzeugung dar, E die durch Integration aus $\dot{E}$ gewonnene Gesamtwärme bis zur Zeit t .

Okulat mit $3 \cdot 10^6$ Zellen durch langsames Drehen der waagrecht liegenden Kammer gleichmäßig verteilt. Am Ende des Versuches bedeckte ein dünner Heferasen die ganze Oberfläche.

Die Plexiglasstempel hatten verschiedene Durchmesser, so daß die Mediummenge zwischen 3,5 und 10,2 ml, der Luftraum in der Kammer zwischen 5,8 und 11,8 ml und die Agaroberfläche zwischen 17,6 und 27,9 cm² variieren konnten. Das Wachstum wurde unter Sauerstoff und unter Stickstoff verfolgt.

In beiden Gasen zeigte sich ein konstanter, von den drei Parametern Mediummenge, Oberfläche und Luftvolumen unabhängiger Zellzuwachs mit starken Streuungen¹⁵⁾.

Der mittlere Endtiter betrug:

$$N_{\infty} = (7,4 \pm 3,1) \cdot 10^8 \text{ Zellen unter } O_2,$$

$$N_{\infty} = (6,9 \pm 3,5) \cdot 10^8 \text{ Zellen unter } N_2.$$

Es bestand also kein signifikanter Unterschied.

Wachstum unter Sauerstoff:

Die insgesamt abgegebene Wärme steigt mit wachsendem Volumen V des Gasraumes linear nach

$$E = 5,5 \cdot V - 14,7 \quad \text{cal} \quad (24)$$

an, während der Zelltiter N_{∞} konstant bleibt. Aus der Konstanz von N_{∞} und dem Ansteigen von E folgt eine entsprechende Zunahme der pro Zelle freigesetzten Energie e mit dem Volumen V

$$e = (0,96 \cdot V - 2,61) \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle.} \quad (25)$$

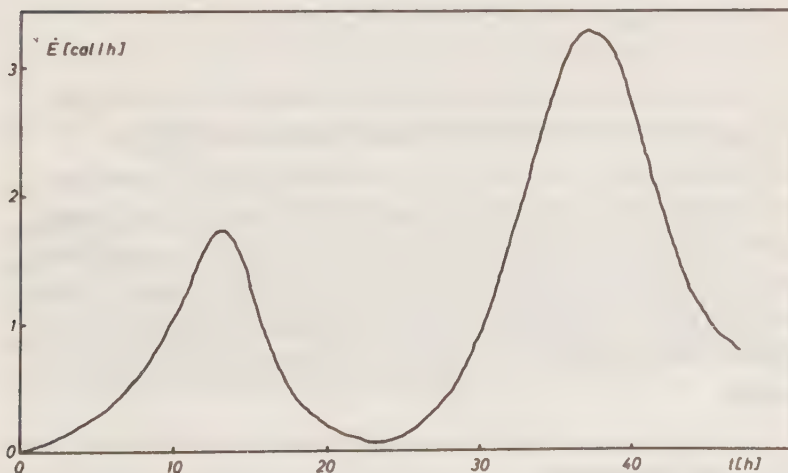


Abb. 22 Wärmeentwicklung bei Wachstum auf Agarmedium nach 18-stündigem Durchleiten von Stickstoff.

Im Gegensatz dazu bleiben die maximale Wärmeentwicklung

$$\overset{\circ}{E}_{\max} = 2,7 \pm 0,5 \quad \text{cal/h} \quad (26)$$

und die auf die einzelne Zelle umgerechnete maximale Wärmeabgabe

$$\dot{e} = (0,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-8} \quad \text{cal/h.Zelle} \quad (27)$$

bei allen Stempeldurchmessern konstant.

Wachstum unter Stickstoff:

Wird der Hohlraum in der Wachstumskammer mit Stickstoff gefüllt, so sind alle untersuchten Größen vom Stempeldurchmesser unabhängig. Die Streuungen der Werte sind unterschiedlich groß.

$$N_{\infty} = (6,9 \pm 3,5) \cdot 10^8 \text{ Zellen}$$

$$E = 15,0 \pm 5,2 \text{ cal}$$

$$e = (2,3 \pm 1,2) \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle}$$

$$\dot{e} = (0,19 \pm 0,07) \cdot 10^{-8} \text{ cal/h.Zelle}$$

$$\overset{\circ}{E}_{\max} = 1,3 \pm 0,3 \text{ cal/h.}$$

Bei Versuchen unter Sauerstoff zeigte sich in den Thermogrammen ein schwaches Anfangsmaximum, das auch nach 20-minütigem Durchleiten von Stickstoff - allerdings wesentlich abgeschwächt - erhalten blieb. Wurde 18 Stunden lang Stickstoff durch die Kammer geperlt und anschließend beimpft, ohne die Kammer zu öffnen, so hatte das Thermogramm zwei ausgeprägte Maxima, zwischen denen der Ausschlag auf Null zurückgehen konnte (Abb. 22). Die Zeit bis zum Auftreten des ersten Maximums entsprach der des Nebenmaximums, doch lag der zweite Extremwert wesentlich später als der übliche Hauptgipfel (vgl. Abb. 22 mit Abb. 21 und 30).

7.10 Betriebsstoffwechsel

Um den Betriebs- im Unterschied zum Baustoffwechsel messen zu können, wurde Zellen der Stämme 211 und 211-1 aM eine Energiequelle (Glucose), aber keine

Stickstoffquelle angeboten. Ein solches Medium schließt eine Vermehrung aus, wie z. B. die Konstanz des Zelltiters während des Versuches zeigt. Die Glucose-Konzentration von 2 % entsprach der eines Vollmediums bzw. der des Mediums 12/4 in den Versuchen 7.7.

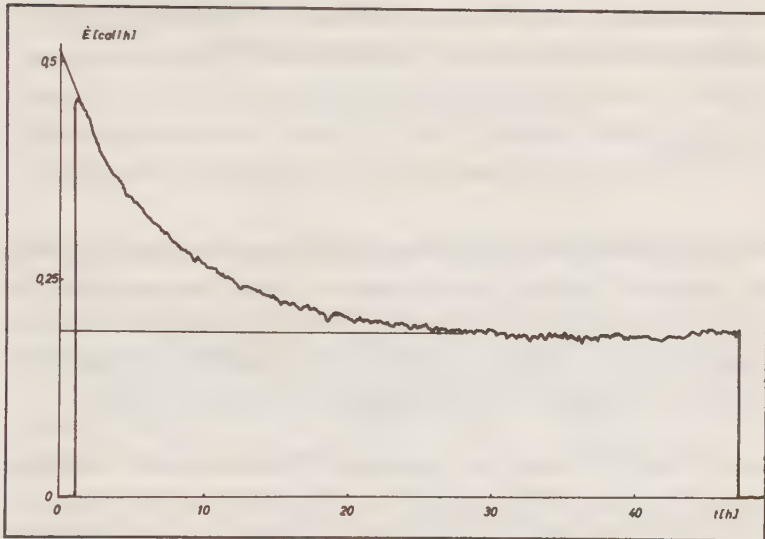


Abb. 23 Wärmeentwicklung beim Betriebsstoffwechsel in 2 % Glucose-Puffer.

Ein typisches Thermogramm des Betriebsstoffwechsels unter Stickstoff gibt Abb. 23 wieder. Nach der zum Abklingen der Reibungswärme benötigten Anfangspassage zeigt sich beim Einschalten ein starker Ausschlag mit einem in den meisten Versuchen auflösbaren Maximum¹⁷⁾ und anschließend ein exponentieller Abfall, der in einen auf längere Zeit konstanten Wert übergeht.

Bestimmt man parallel zur Wärmeentwicklung die Glucose-Konzentration der Lösung, so findet man ebenfalls zu Beginn eine starke Verringerung der Konzentration,

17) Auf das sofortige Einsetzen der Fermentierung hat schon RUBNER (1904) hingewiesen.

die sich in einer linearen Abnahme mit der Zeit fortsetzt. Dieses Ergebnis stimmt mit der Erwartung überein, daß einer konstanten Wärmeentwicklung ein konstanter Glucose-Verbrauch entsprechen sollte.

Aus dem Kalorimetrausschlag im "stationären Zustand" und der zugehörigen Glucose-Abnahme bzw. aus der bis zur vollständigen Erschöpfung der Energiequelle abgegebenen Wärme errechnet sich ein Umwandlungsquotient

$$q = 26,4 \pm 4,5 \text{ kcal/Mol Glucose}$$

entsprechend

$$q' = 147 \pm 25 \text{ cal/g Glucose}^{18)}$$

Ebenso kann man die pro Mol Glucose abgegebene Wärme ermitteln, wenn man die dem Rechteck aus Zeitdauer des Experimentes und Endausschlag entsprechende Wärme mit der Glucosemenge vergleicht, die sich aus der Multiplikation der Glucose-Abnahme pro Zeit mit der Dauer ergibt. Der so gewonnene Glucose-Schwund ist kleiner als der tatsächliche, da der Anfangsabfall unberücksichtigt bleibt.

Diese Differenz läßt sich mit der dreieckartigen Fläche zwischen der Energiekurve, der dem "stationären Endwert" entsprechenden Horizontalen und der Senkrechten im Punkt "Null" in Verbindung bringen. Der Umwandlungsquotient für diesen Teil des Thermogrammes beträgt

$$21,5 \text{ kcal/Mol Glucose}$$

und stimmt mit dem Wirkungsgrad überein, den man für Wachstum in Minimalmedium verschiedener Glucose-Konzentration erhält.

Dividiert man diese anfängliche Energieentwicklung durch den Zelltitel, so beläuft sich die Wärmeabgabe auf

$$(0,39 \pm 0,08) \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle (Stamm 211-1aM)}$$

und

$$(0,98 \pm 0,08) \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle (Stamm 211),}$$

im Mittel also auf

$$(0,88 \pm 0,08) \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle}$$

18) z.B. finden FORREST u. Mit. (1961) eine Wärmeabgabe von 172 cal/g Glucose bei einer Fermentierung durch *S. faecalis*.

für diploide Zellen ¹⁹⁾ gegenüber

$$5,42 \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle}$$

bei Wachstum in 2 %igem Minimalmedium.

Das Anfangsmaximum fällt wesentlich kleiner aus, wenn die Zellen nicht wie üblich der stationären Phase, sondern der log-Phase entnommen werden. In gluceisefreiem Puffer ist nur der zeitlich konstante endogene Stoffwechsel nachzuweisen, dessen Thermogramm eine Parallele zur Zeitachse darstellt. Unter 8.3 wird das Anfangsmaximum mit dem Auffüllen von Zelldepots in Verbindung gebracht.

7.11 Wärmeentwicklung bei Wachstum nach UV- und Röntgenbestrahlung

Die Wärmeabgabe beim Wachstum von Hefen in Abhängigkeit von der Strahlendosis wurde an dem UV-sensiblen Stamm S 21 und dem Röntgen-sensiblen Stamm S 16 (s.6.1) untersucht, da diese Stämme gegenüber dem sonst benutzten Stamm 211 eine wesentlich gesteigerte Strahlenempfindlichkeit haben (LASKOWSKI und AVERBECK 1968).

In allen Versuchen wird, unabhängig von eingestrahelter Dosis, untersuchtem Stamm und benutztem Anfangstitern, stets eine Wärme

$$E = 21,4 \pm 2,5 \text{ cal}$$

von 10 ml Medium abgegeben.

Ebenso zeigt der Zellendtitern N_{∞} keine Abhängigkeit von der Wahl des Stammes und der eingestrahelten Dosis, doch sind die Streuungen um den Mittelwert größer ¹⁵⁾. Aus der Konstanz von E und N_{∞} folgt die Konstanz der pro Zelle freigesetzten Energie e. Da es sich aber um einen integralen Wert handelt (Gesamtwärme/Zellzuwachs während des gesamten Wachstums), werden u.U. vorhandene dosisabhängige Anfangseffekte überdeckt.

19) Unter der Annahme, daß der Wert für eine diploide Zelle doppelt so groß ist wie für eine haploide (s.8.4), ist der Mittelwert aus $2 \times 0,39 \cdot 10^{-8}$ und $0,98 \cdot 10^{-8}$ gebildet worden.

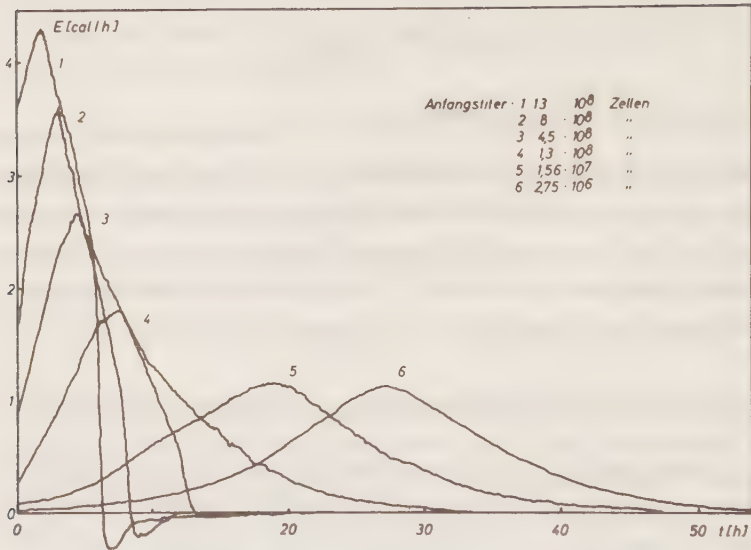


Abb. 24 Abhängigkeit der Form der Wachstumskurven des Stammes S 21 von verschiedenen Anfangstitern.

Diese lassen sich leichter überprüfen, wenn man bestrahlte Zellen in variabler Anfangskonzentration, die der Anzeigegenauigkeit wegen wesentlich über dem sonst verwandten Anfangstitel von $3 \cdot 10^6$ Zellen liegt, in 2 %igen Glucose-Puffer überführt. In diesem Medium findet nur Betriebsstoffwechsel und kein Wachstum statt (§.7.10).

Bei UV-bestrahlten Zellen des Stammes S 21 durchläuft das Thermogramm des Betriebsstoffwechsels ein nicht allzu ausgeprägtes, aber stets vorhandenes Maximum und stellt sich dann auf einen konstanten Wert (Parallele zur Zeitachse) ein. Im Mittel liegt dieser Endwert bei

$$0,1 \cdot 10^{-8} \text{ cal/h. Zelle}$$

und deckt sich mit Werten, die man für unbestrahlte Zellen desselben Stammes in Glucose-Puffer findet.

Bei der Analyse der Form der Wachstums-Thermogramme nach Bestrahlung (Abb. 25

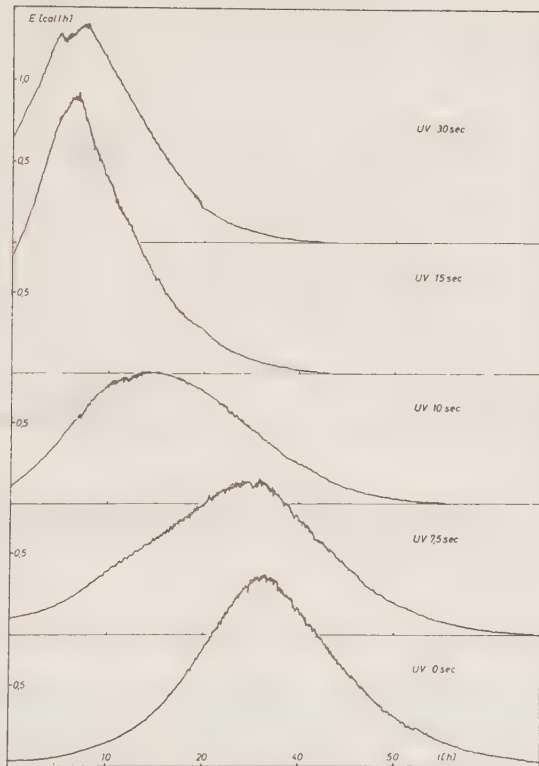


Abb. 25 Änderung der Form der Wachstumskurve des Stammes S 21 bei verschiedenen Bestrahlungszeiten. Die UV-Dosisleistung beträgt $1,2 \cdot 10^4$ erg/s in der Quecksilberlinie 254 nm ($5 \cdot 10$).

und 26 a,b) ist zu beachten, daß durch die Strahlung ein bestimmter Anteil der Zellen abgetötet wird. Geht man von den sonst in dieser Arbeit verwandten $3 \cdot 10^6$ Zellen als Anfangstiter aus, so scheint in den Thermogrammen die biologische lag-Phase vergrößert zu sein (Abb. 26a). Tatsächlich aber handelt es sich darum, daß die vorhandenen überlebenden Zellen erst auf einen Titer $3 \cdot 10^6$ anwachsen müssen, bei dem die Ansprechempfindlichkeit des Kalorimeters erreicht wird. Mit steigenden Dosen wächst die Abtötungsrate und damit die Zeit bis zum

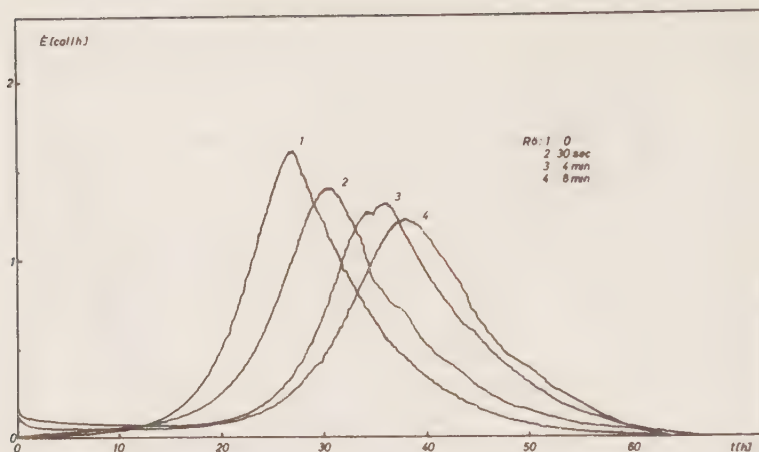


Abb. 26a Verlängerung der "lag-Phase" der Wachstumskurven des Stammes S 16 nach Röntgenbestrahlung (Dosisleistung 3,3 krad/min) bei konstantem Anfangstiter.

Eintritt in die log-Phase, doch ändert sich die Form der Kurve nicht.

Ermittelt man dagegen vorher die Abtötungsrate für eine bestimmte Bestrahlungsdosis und benutzt einen Anfangstiter von $3 \cdot 10^6$ lebenden Zellen (also wesentlich mehr Zellen insgesamt), so ist sofort ein Ausschlag zu beobachten, der mit der Dosis, d.h. also auch mit der Zellzahl im Okulat anwächst. Abb. 24 zeigt die Änderung der Thermogrammform des Stammes S 21 ohne Bestrahlung bei verschiedenen Anfangstitern, Abb. 25 die Thermogramme desselben Stammes nach Bestrahlung bei konstantem Anfangstiter lebender Zellen.

Das Verhalten des Stammes S 16 nach Röntgenbestrahlung und des Stammes 211-1aM nach UV-Behandlung mit Dosen, die zu vergleichbaren Inaktivierungen führen, ist völlig anders als für den Stamm S 21 beschrieben (Abb. 26 b), obwohl auch hier von einem annähernd konstanten Anfangstiter lebender Zellen ausgegangen wurde. Man beobachtet einen steilen Anfangsanstieg und eine immer deutlichere Ausbildung eines Plateaus mit zwei nicht sehr ausgeprägten Maxima. Es handelt sich offensichtlich um zwei zeitlich gegeneinander verschobene Prozesse, deren Energieentwicklungen sich überlagern. Da nur Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle zur Verfügung

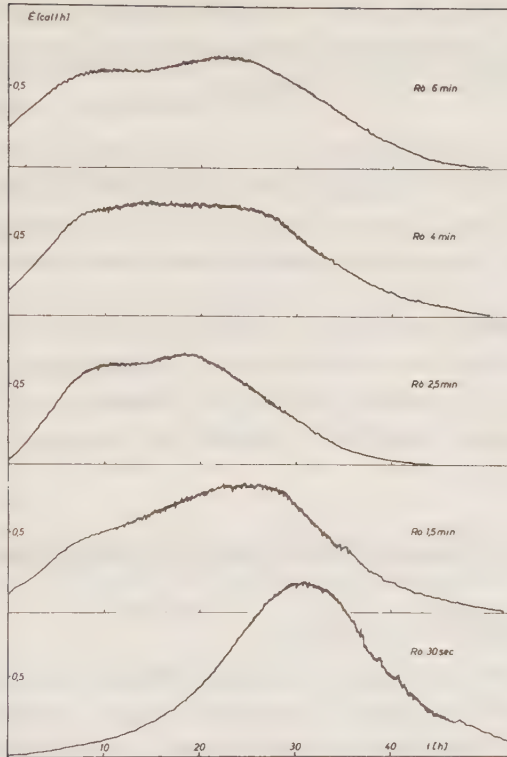


Abb. 26b Änderung der Form der Wachstumskurven des Stammes S 16 nach Röntgenbestrahlung (Dosisleistung 3,3 krad/min) bei konstantem Anfangstitel lebender Zellen.

steht, ist an eine Diauxie nicht zu denken. Ein Übergang von Atmung zu Gärung ist ebenfalls ausgeschlossen, da das ganze Wachstum unter Stickstoff erfolgt und das Medium frei von Sauerstoff ist.

7.12 Betriebsstoffwechsel nach Bestrahlung

Der Betriebsstoffwechsel des Stammes 211-1aM nach Röntgen- und des Stammes S 21 nach UV-Bestrahlung wurde in 2 % Glucose-Puffer (ohne Stickstoff-Quelle) untersucht. Bei Dosen, welche die Form der Thermogramme beim Wachstum grund-

legend variieren (Abb. 25 und 26b), sind keine Änderungen des Maximalausschlages, des auf ihn folgenden Abfalls und des stationären Endausschlages im Kurvenverlauf des Betriebsstoffwechsels zu beobachten.

Möglicherweise findet ein leichter Anstieg der Energie statt, die dem Aufbau von Speicherstoffen der Zelle zugeordnet wurde, doch sind die Streuungen groß. Eine solche Zunahme wäre so zu deuten, daß neben der Anlage von Depots Reparaturprozesse ablaufen, die mit einem zusätzlichen Energieumsatz verbunden sind.

Nach Untersuchungen von HEMPEL und LASKOWSKI (1964) wird die Gärung erst bei UV- oder Röntgendosen deutlich gehemmt, die zu einer Abtötung von $1 : 10^5$ führen (gemessen als Unfähigkeit, Makrokolonien auf Agarmedium zu bilden). In dem hier untersuchten Dosis-Bereich dürfte daher keine Änderung des Stoffwechsels zu erwarten sein.

7.13 Temperaturabhängigkeit der Wärmeerzeugung und des Wachstums

7.13.1 Messungen mit dem Kalorimeter

Um den Einfluß der Umgebungstemperatur auf das Wachstum und die Wärmeentwicklung von Hefezellen zu bestimmen, wurde die Wärmeabgabe in einem Minimalmedium 4/4 (s. 6.4) als Funktion der Kalorimetertemperatur ϑ (in °C) aufgenommen und der Zelltiter am Ende des Versuches durch Auszählen ermittelt.

Alle Kurven folgen weitgehend der logistischen Funktion (s. A1). Der Mittelwert der bei den verschiedenen Temperaturen abgegebenen Wärme beträgt

$$E = 8,60 \pm 0,80 \text{ cal} \quad (28)$$

bei einem Zellzuwachs N_{∞} , der eine Abnahme mit steigender Temperatur zeigt und durch

$$N_{\infty} = (-0,10 \cdot \vartheta + 5,9) \cdot 10^8 \quad (29)$$

darzustellen ist.

Aus der Konstanz von E und der Temperaturabhängigkeit von N_{∞} folgt für die pro Zelle freigesetzte Energie

$$e = E / N_{\infty}$$

eine Zunahme mit steigender Temperatur. Der Anstieg läßt sich in dem engen untersuchten Temperaturintervall durch die Gerade

$$e = (0,08 \cdot T + 0,5) \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle} \quad (30)$$

wiedergeben²⁰⁾.

Kennt man den Zusammenhang zwischen absoluter Temperatur T (in °K) und Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k = k(T)$, so kann man aus der Geschwindigkeitsgleichung der Reaktionskinetik

$$k = \frac{k \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta H^+}{RT} + \frac{\Delta S^+}{R}} \quad (60)$$

die Aktivierungsgrößen ΔH^+ , ΔS^+ und ΔG^+ ermitteln (s. A 2). Über den logistischen Ansatz (s. A 1) läßt sich die Geschwindigkeitskonstante der Wärmeentwicklung k aus

$$k = 4 \cdot \overset{\circ}{E}_{\max} / E \quad (31)$$

berechnen. Regressionsanalyse liefert bei einer Standardabweichung $s = \pm 0,05$ und einem Korrelationskoeffizienten $r = -0,91$

$$\log k = -1,87 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{T} + 5,67. \quad (32)$$

Diese Abhängigkeit ist in Abb. 27 dargestellt.

Nach Gl. (31) gilt für die maximale Wärmeerzeugung $\overset{\circ}{E}_{\max}$

$$\log \overset{\circ}{E}_{\max} = \log E \cdot k / 4 = \log k + \log E - \log 4. \quad (33)$$

Mit $E = 8,60$ (Gl. 28) folgt

$$\log \overset{\circ}{E}_{\max} = \log k + 0,93 - 0,60 = \log k + 0,33. \quad (34)$$

20) (30) wurde durch Regressionsanalyse aus den e-Werten und nicht durch Division von (28) durch (29) gewonnen.

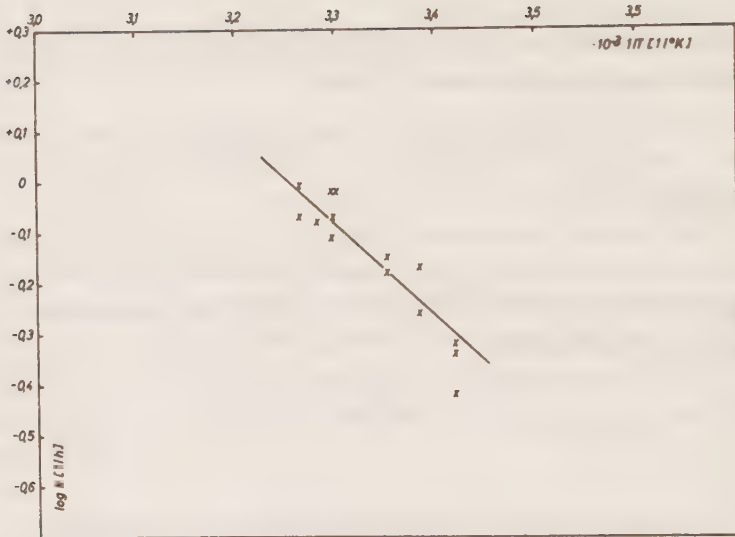


Abb. 27 Abhängigkeit des dekadischen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten k der Wärmeentwicklung vom Kehrwert der absoluten Temperatur T .

Damit ergibt sich aus (32) und (34)

$$\begin{aligned} \log \overset{\circ}{E}_{\max} &= -1,87 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{T} + 5,67 + 0,33 \\ &= -1,87 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{T} + 6,00. \end{aligned} \quad (35)$$

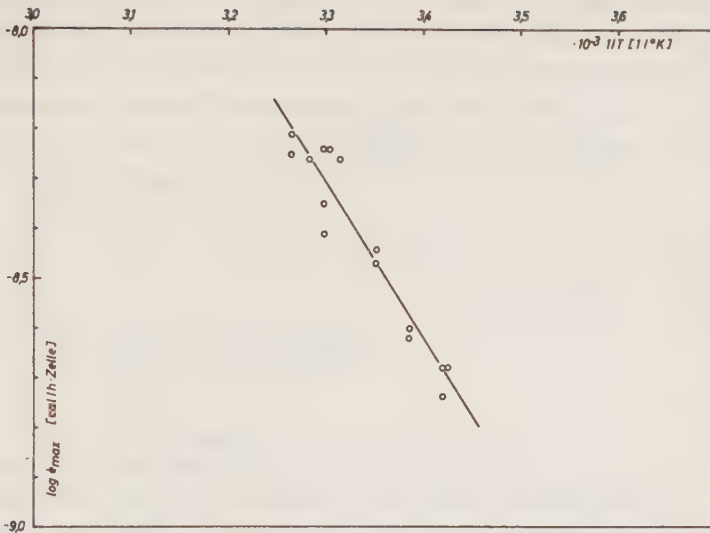
Mittels Regressionsanalyse findet man aus den einzelnen $\overset{\circ}{E}_{\max}$ -Werten

$$\log \overset{\circ}{E}_{\max} = -1,85 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{T} + 5,96. \quad (36)$$

Schließlich ergibt eine Regressionsanalyse für die Abhängigkeit der Wärmeentwicklung pro Zelle von der absoluten Temperatur die Gleichung

$$\log \dot{e} = -3,07 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{T} + 1,81 \quad (37)$$

(Abb. 28).



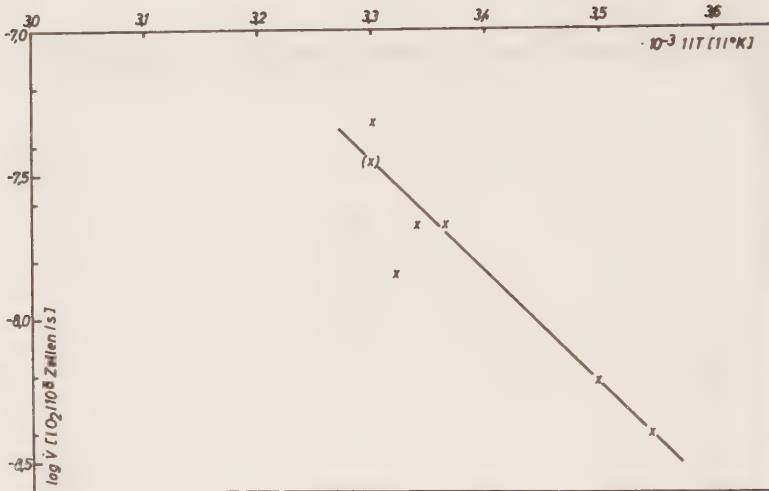


Abb. 29 Dekadischer Logarithmus des sekundlichen Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit vom Kehrwert der absoluten Temperatur.

mit $r = -0,98$ und $s = \pm 0,02$.

Beim zweiten Verfahren wird die Trübung einer Glaskammer kontinuierlich von einem Schreiber aufgezeichnet. Für diesen Versuch wurde ein Thermostatenmantel entwickelt, der die Trübungsmessung mittels Photozelle und magnetisches Rühren des Kammerinhaltes erlaubt und an einen hochkonstanten Umwälzthermostaten angeschlossen werden kann. Aus den Wachstumskurven ergibt sich für die Konstante k

$$\log k = -4,26 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{T} \pm 13,68 \quad (39)$$

($r = 0,99$; $s = \pm 0,02$).

7.13.3 Messung des Betriebsstoffwechsels

Mit einem Warburg-Apparat²²⁾ wurde der Betriebsstoffwechsel als Funktion der

22) Warburg-Apparat der Firma BRAUN / Melsungen.

Temperatur gemessen, d.h. der Sauerstoffverbrauch von je 10^8 Zellen nach einer bestimmten Zeit ermittelt. Aus der Volumenverminderung nach 50 Minuten wurde der sekundliche Sauerstoffverbrauch bei den verschiedenen Temperaturen berechnet und sein Logarithmus über dem Kehrwert der absoluten Temperatur aufgetragen (Abb. 29). Auf die Geschwindigkeitskonstante k umgerechnet ergibt sich mit $r = -0,99$ und $s = \pm 0,08$

$$\log k = -4,01 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{T} + 11,15, \quad (40)$$

8. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

8.1 Form der Thermogramme

Alle Aussagen über thermodynamische Größen, die das Mikrokalorimeter E. Calvet liefert, müssen den Thermogrammen entnommen werden, d.h. der Aufzeichnung des Wärmeflusses als Funktion der Zeit. So ist z.B. die gesamte abgegebene Wärme E gleich dem Zeitintegral des Wärmeflusses $\dot{E}$ und damit gleich der Fläche zwischen Null-Linie und aufgeschriebener Kurve.

In dieser Arbeit wurden drei Typen von Thermogrammen gewonnen und ausgewertet: die Kurvenform, die sehr genau dem logistischen Ansatz (s. A 1) folgt und beim Wachstum in flüssigem Medium zu beobachten ist, die Wärmeflußkurve beim Wachstum auf Agarmedium und schließlich die Thermogramme des Betriebsstoffwechsels in stickstoff-freiem Glucose-Puffer. Alle drei Formen können durch Variation der Versuchsparameter verändert werden, doch behalten sie ihren Grundcharakter bei.

Im Anhang A 1 wird gezeigt, daß sich bestimmte Zeitabhängigkeiten des Wärmeflusses gut durch den logistischen Ansatz wiedergeben lassen (Abb. 33, 34). Dieser Verlauf der Thermogramme, der einer Glockenform ähnelt, ist stets bei Wachstum in flüssigem Medium zu beobachten, wenn bestimmte Grenzwerte nicht überschritten werden (Abb. 14, 21, 33, 34). Sie ist in den untersuchten Bereichen von der Wahl des Hefestammes, der Aminosäuren-Konzentration (7.8) und der Wachstumstemperatur (7.13) unabhängig. Solange die Glucose-Konzentration 0,20 mMol/ml nicht übersteigt, bleibt die Form unverändert, bei Konzentrationen von 0,26 mMol/ml und

mehr geht ihr ausgeprägtes Maximum in einen breiteren Scheitelwert mit Nebenmaximum über (Abb. 14 und Anm. 13, S. 44).

Überschreitet der Anfangstiter den als günstig abgeschätzten Wert $3 \cdot 10^6$ Zellen (6.3), so wird das Maximum mit wachsendem Titer immer ausgeprägter und tritt immer früher auf (Abb. 24). Diese Verschiebung erfolgt so, daß die Flächen unter den Kurven konstant bleiben. Die Erklärung ist, daß der hohe Glucoseverbrauch schon früh zu einer Erschöpfung des Mediums und damit zu einer drastischen Reduktion des Wärmefflusses führt. Für den in Abb. 24, Kurven 1, 2 und 3 zu beobachtenden Umschlag von einer exothermen in eine endotherme Reaktion (Absinken unter die Null-Linie) sind wahrscheinlich physikalische Prozesse verantwortlich zu machen (Verdampfen von gebildetem Alkohol oder Übertritt von Kohlendioxid in die Gasphase, s.a.7.3).

Das Koloniebildungsvermögen der Hefe wird schon bei wesentlich niedrigeren Strahlendosen geschädigt als der Stoffwechsel (HEMPEL und LASKOWSKI 1964). Der hohe Anfangsausschlag in den Thermogrammen nach UV-Bestrahlung bei gleichem Anfangstiter lebender Zellen (Abb. 25) stammt also z.T. vom nicht geschädigten Stoffwechsel aller Zellen. Das in der obersten Kurve auftretende Doppelmaximum ist nur nach hohen UV-Dosen, dann aber stets, zu finden. Wird dagegen der Versuch bei konstantem Anfangstiter und steigenden UV-Dosen durchgeführt, so bleibt die normale Form der Kurven erhalten, nur werden sie insgesamt nach rechts, d.h. zu längeren Zeiten hin verschoben (entsprechend Abb. 26 a für Röntgenbestrahlung).

Bei Röntgenbestrahlung tritt eine deutliche Veränderung der Kurvenform mit wachsenden Dosen auf (Abb. 26b), die sich als Superposition von 2 Prozessen interpretieren läßt. Dabei wäre das erste Maximum und das rasche Ansteigen zu Beginn nicht-geschädigten Stoffwechselvorgängen, das zweite Maximum dem teilungsaktiven Wachstum zuzuschreiben.

Abb. 21 zeigt, wie sich die Thermogramme beim Wachstum in flüssigem und auf Agarmedium unterscheiden. In Abb. 21 unten und Abb. 30 sind 2 typische Kurven des Agar-Wachstums wiedergegeben. Der Abfall nach Überschreiten des Maximums kann in manchen Versuchen noch steiler sein, braucht aber auch dann nicht bis zur Null-Linie zu gehen, sondern kann zu einer auf längere Zeit parallel zur

Zeitachse verlaufenden Geraden führen, die einer konstanten Wärmeentwicklung pro Zeit entspricht. Im Anfangsteil des Thermogrammes tritt ein kleines Nebenmaximum auf (Abb. 21), das nach Abb. 30 durch die Überlagerung zweier Kurven

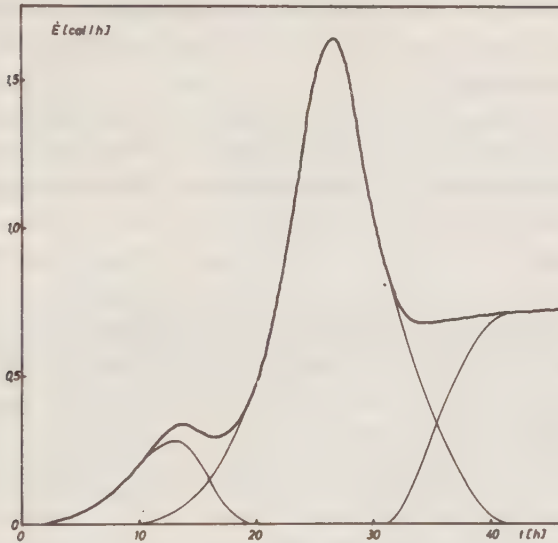


Abb. 30 Deutung der Wachstumskurve (Agarmedium) als Überlagerung dreier exothermer Prozesse.

entsteht (Deutung in 8.3). Daß Neben- und Hauptmaximum völlig getrennt werden können, zeigt Abb. 22. Der nahezu konstante Endausschlag ist möglicherweise auf Eindiffundieren von Sauerstoff in die Wachstumskammer und Veratmung des gebildeten Alkohols in einer Schicht an der Oberfläche des Agars zurückzuführen.

Als dritte grundsätzliche Form der Thermogramme ist der Verlauf der Wärmeentwicklung bei Betriebsstoffwechsel in stickstoff-freiem Glucose-Puffer anzusehen (Abb. 23). Einem steilen Anfangsmaximum folgt ein Abfall auf einen konstanten, zur Zeitachse parallelen Wert. Das Maximum ist umso ausgeprägter, je länger sich die Zellen in der stationären Phase der Vorkultur befanden. Werden sie der logarithmischen Phase entnommen oder in Puffer ohne Glucose suspendiert, so verschwindet das Maximum fast vollständig (Erklärung unter 8.3).

8.2 Endtiter beim Wachstum

Zum Abschluß jedes Experimentes wurde der Endtiter N_{∞} der Zellen durch Auszählen in einer BÜRKER-TÜRK-Hämatocytometer-Kammer ermittelt. Da in allen Versuchen der Stoffwechsel und nicht das Koloniebildungsvermögen interessierte, zählte jede Zelle einzeln, gleichgültig, ob sie in Klumpen mit anderen Zellen vereinigt war oder nicht.

Der Fehler der Zählung liegt bei 10 %, doch zeigen die Meßergebnisse wesentlich größere Schwankungen (Abb. 17). Dadurch wachsen auch die Abweichungen vom Mittelwert der Größen e und $\bar{e}$, die ja mittels Division durch N_{∞} gewonnen werden (Abb. 16, 18).

Diese Abweichungen erklären sich daraus, daß nicht die Zellzahl, sondern die gebildete Zellmasse das Äquivalent der gespeicherten Energie (bzw. des gespeicherten Kohlenstoffs) darstellt. Nur wenn bei allen Versuchen die Zellen eine gleiche mittlere Größe hätten, wäre das Gesamtvolumen durch die Zellzahl zu ersetzen. Wegen des kleinen Volumens der Kalorimeterkammern und der daraus folgenden geringen Zellmasse (4 mg bei im Mittel $3 \cdot 10^8$ Zellen mit $14 \cdot 10^{-12}$ g Trockengewicht) ist eine Gewichtsbestimmung mit größerer Genauigkeit nicht durchführbar. Da auch eine kolorimetrische Ermittlung der Zellmasse ohne wesentliche Fehler nicht möglich war, mußte mit der Zählung vorlieb genommen werden²³⁾.

Abb. 17 zeigt den hyperbolischen Anstieg des Zellendtiters N_{∞} mit der Glucose-Konzentration, der sich durch Formel (17) beschreiben läßt. Verschiedene Autoren (z.B. BOIVINET 1964) haben eine lineare Zunahme des Zellzuwachses mit steigenden Glucose-Konzentrationen gefunden. Diese Ergebnisse sind mit den hier gewonnenen Resultaten in Übereinstimmung, da die von BOIVINET verwendeten Glucose-Konzentrationen sehr gering waren und der Zellzuwachs damit in den linearen Teil der N_{∞} -Kurve fällt (Abb. 17).

Man kann den Anfangsanstieg der N_{∞} -Kurve durch die Tangente im Nullpunkt mit

23) Für diese Untersuchungen wäre ein automatischer, das Zellvolumen erfassender Zellzähler (z.B. COULTER-Counter) mit nachgeschaltetem Vielkanalanalysator zur Ermittlung der Volumverteilung der Zellen besonders geeignet.

der Gleichung

$$t \equiv N_{\infty} = 1,70 \cdot 10^8 K_0 \quad (41)$$

ersetzen. Rechnet man die Steigung in absolute Einheiten um, so ergibt sich eine Ausbeute von

$$1,1 \cdot 10^{10} \text{ Zellen/g Glucose}$$

(Tab. 6). Ein g Glucose enthält $2 \cdot 10^{22}$, eine diploide Hefezelle $17 \cdot 10^{10}$ Kohlenstoffatome (HEFEN, Bd. I, S. 540). Insgesamt gehen demnach von $2 \cdot 10^{22}$ C-Atomen der Glucose

$$1,1 \cdot 10^{10} \cdot 17 \cdot 10^{10} = 2 \cdot 10^{21}$$

in Zell-C-Atome über, d.h. jedes 10. Kohlenstoffatom wird als Zellbaustein benutzt. BATTLE (1960) findet, daß 10,1 % des Glucose-Kohlenstoffs bei anaerobem Wachstum ins Zellmaterial eingebaut werden. Dagegen sind WINZLER und BAUMBERGER (1938) der Meinung, daß bei der alkoholischen Fermentierung bis zu 30 % der Glucose gespeichert werden können. - Die oben gewonnenen Abschätzungen gelten nur für kleine Glucose-Konzentrationen, da bei höheren Konzentrationen immer geringere Kohlenstoffanteile zum Zellaufbau herangezogen werden.

Beim Übergang von Minimal- zu Vollmedium (7.8) steigt der Endtiter N_{∞} mit wachsender Aminosäuren-Konzentration (Abb. 20). Da die Energie- und Kohlenstoffquelle in allen Versuchen konstant bleibt, ist also das Wachstum der Zellen in Vollmedium effektiver. Dieses Ergebnis ist plausibel, da wesentliche Syntheseleistungen nicht ausgeführt zu werden brauchen. Im umgekehrten Sinn wirkt sich eine Erhöhung der Wachstumstemperatur (7.13), d.h. eine Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit (s. Gl. (29)) aus. Höhere Temperaturen bedeuten für die Zelle einen thermodynamisch ungünstigeren Fall, da der irreversible Anteil aller Prozesse zunimmt.

Schließlich ist beim Wachstum auf Agarmedium kein Unterschied im Endtiter festzustellen, wenn die Zellen unter Sauerstoff statt unter Stickstoff gezüchtet werden (7.9). Wie Mikrophotographien zeigen, sind die Zellen unter O_2 im Mittel etwas größer als die unter N_2 , doch ist die Differenz klein gegenüber den statistischen Schwankungen der Zellgröße.

8.3 Wärmeabgabe und Wirkungsgrad

Bei der kalorimetrischen Untersuchung des Baustoffwechsels zeigt sich, daß die bei stets vollständig verbrauchter Glucose insgesamt abgegebene Wärme E nur von der Konzentration der Energiequelle des Mediums abhängig ist (7.7), nicht aber von der Wachstumstemperatur (7.13), der Aminosäuren-Konzentration des Mediums (7.8) oder der applizierten Strahlendosis (7.11). Tabelle 5 gibt die für verschiedene Versuche gefundenen Umwandlungsquotienten q (entwickelte Wärme in kcal pro Mol umgesetzter Glucose) wieder.

Tabelle 5
PRO MOL UMGESETZTER GLUCOSE ABGEBENE
WÄRME BEI ANAEROBEM WACHSTUM

	q (kcal / Mol)
7.4 Baustoffwechsel	21,5
7.7 Baustoffwechsel	22,3
7.8 Baustoffwechsel	22,4
7.10 Auffüllen von Depots	21,5
7.11 Baustoffwechsel	21,2
7.13 Baustoffwechsel	24,4
gemittelt	22,2
7.10 Betriebsstoffwechsel (z.Vgl.)	26,4

Bei der alkoholischen Gärung werden pro Mol Glucose 2 Mol ADP in ATP umgewandelt, so daß von der verfügbaren freien Enthalpie $\Delta G = 56$ kcal/Mol Glucose

$$2 \cdot 10 = 20 \text{ kcal/Mol Glucose}$$

unter physiologischen Bedingungen in Form der energiereichen Bindung des ATP in der Zelle gespeichert werden können. Darüber hinaus muß ein weiterer Energiespeicher vorhanden sein, da bei einer Wärmeentwicklung von 22,2 kcal/Mol Glucose

$$56 - 2 \cdot 10 - 22,2 \approx 14 \text{ kcal/Mol Glucose}$$

nicht im ATP gespeichert und nicht als Wärme abgegeben werden. Insgesamt findet man also einen Wirkungsgrad von $(56 - 22,2) / 56$; d.h. es werden rund 60 % der freien Enthalpie der Gärung von der Zelle verwertet, 40 % als Wärme abgegeben.

Tabelle 6
ENERGIEABGABE PRO MOL ZUCKER, WÄRMEABGABE PRO ZELLE UND
ZAHL DER PRO G ZUCKER GEBILDETEN ZELLEN BEI ANAEROBEM
WACHSTUM VON HEFEN

	Zucker	Energieabgabe in		10^{10} Zellen g Zucker	Autor
		$\frac{\text{kcal}}{\text{Mol Zucker}}$	$\frac{10^{-8} \text{ cal}}{\text{Zelle}}$		
Hefen	Rohrzucker	51,2	9,0	0,16 +	RUBNER (1904)
Sacch.cer. (Hansen)	Glucose	22,7 ++	2,1 ++	0,6 +	BATTLE (1960)
		18,9	1,7		
Sacch.cer. Stamm 211p	Glucose	-	-	1,5	POHLIT (1966)
Bäckerhefe	Glucose	19,7	1,8	0,6	OHLMEYER (1966)
Sacch.cer. Stamm 211	Glucose	22,2	1,0	1,1	LAMPRECHT

+) abgeschätzt

++) obere Zeile: Medium nicht gerührt, untere Zeile: Medium gerührt

In Tabelle 6 sind einige der Literatur entnommene Daten über anaerobes Wachstum von Hefen zusammengestellt und mit eigenen Messungen (letzte Zeile) verglichen. Bei dem ersten Wert (RUBNER 1904) ist zu bedenken, daß 1 Mol Rohrzucker als Disaccharid praktisch 1 Mol Glucose und 1 Mol Fructose enthält, der Energiegehalt also etwa doppelt so groß ist.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen an Hefen maßen SENEZ und BELAICH (1965) bei der Milchsäuregärung von *P.lindneri* eine Wärmeabgabe von 32,6 kcal/Mol Glucose

und schlossen daraus, daß bei diesem Organismus die Wachstumswärme nicht nachzuweisen ist (s. Anm. 18, S. 56).

Die Untersuchungen 7.6 haben gezeigt, daß in der Anfangsphase des Wachstums, d.h. bei genügendem Glucoseangebot, kein Unterschied in den Wärmeabgaben beim Wachstum unter Stickstoff oder unter Sauerstoff zu beobachten ist.

Bei steigender Glucose-Konzentration des Mediums ist die kalorimetrisch gemessene Wärme eine lineare Funktion des Glucose-Gehaltes (7.7). Zu einer Glucose-Konzentration $K_0 = 0$ gehört eine Wärmeabgabe $E(0) = 0$, wenn man von einem endogenen Stoffwechsel absieht. Entsprechende Ergebnisse wurden von BOIVINET (1964) an *S. lactis* und von BELAICH (1963) sowie SENEZ und BELAICH (1965) an *P. lindneri* und *E. coli* gewonnen.

Im Gegensatz zum flüssigen Medium tritt beim Wachstum auf Agarmedium ein schwaches Anfangsmaximum auf, das nach Abb. 30 auf einen speziellen Energieumsetzungsprozeß zurückgeführt werden kann. BELAICH (1963) und BOIVINET (1964) haben ähnliche Effekte bei anaerobem Wachstum in flüssigem Medium beobachtet und als Sauerstoffeffekt gedeutet. Bei eigenen Versuchen mit flüssigem Medium zeigte sich das Anfangsmaximum nur dann, wenn nach dem Beimpfen kein Stickstoff durch das Medium gepert wurde. Andererseits läßt sich das Maximum bei Agarwachstum dadurch verringern, daß länger Stickstoff durch die Kammer geleitet wird.

Ein Agarmedium besteht zu über 90 % aus Wasser. Mit einer Sauerstofflöslichkeit von

$$0,026 \text{ Ncm}^3 (\text{Gas}) / \text{g} (\text{H}_2\text{O})$$

können 10 ml Agar bei 30° C rund 10^{-5} Mol Sauerstoff lösen. Gegenüber den in 10 ml Medium 4/4 enthaltenen $37 \cdot 10^{-5}$ Mol Glucose ist also Sauerstoff der begrenzende Faktor. Wenn er zur Hälfte zur Atmung ausgenutzt würde, könnten etwa 4 cal freigesetzt werden. Die für das Nebenmaximum experimentell gefundenen Wärmen (Fläche unter der linken Kurve in Abb. 30) haben einen Mittelwert von $1,9 \pm 0,6$ cal. Das ist ein Wert, der bei einem Wirkungsgrad von 60 % (s.o.) der Abschätzung etwa entsprechen und zusammen mit den obigen Ergebnissen die Annahme eines Sauerstoff-Effektes stützen würde.

Messungen des Betriebsstoffwechsels (7.10) liefern einen Umwandlungsquotienten

$$q = 26,4 \pm 4,5 \text{ kcal / Mol Glucose,}$$

d.h. einen Wirkungsgrad von ca. 53 %, der etwas kleiner als der des Baustoffwechsels ist ²⁴⁾. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über Fermentierungswärmen bei Hefen. Bei

Tabelle 7
FERMENTIERUNG DURCH HEFEN

	Energie- quelle	Tempe- ratur	10 ⁻¹⁴	kcal Mol Zucker	Autor
			Mol Zucker h. Zelle		
verschiedene Hefen	Rohrzucker	22 bis 38°	4 ⁺	51,2	RUBNER (1904)
Bäcker- hefe	Rohrzucker	17°	1	65	HILL (1911)
Hefe	Glucose	?	2,4 ⁺	23,4	COON (1933)
Hefe	Glucose	25°	-	14,2	WINZLER (1938)
S.apicul.	Glucose	30°	3,5	-	INGRAM (1955)
Brauhefe	Glucose	30°	6	-	INGRAM (1955)
Backhefe	Glucose	30°	5	-	INGRAM (1955)
S.cerevisiae Stamm 211	Glucose	30°	7	-	HEMPEL (1964)
Bäckerhefe	Glucose	28°	10	16,9	OHLMEYER (1966)
S.cerevisiae Stamm 211	Glucose	30°	3	26,4	LAMPRECHT

Für Rohrzucker (Zeile 1 und 2) als Disaccharid müßten zum Vergleich mit Glucose die Werte der Spalte 4 verdoppelt, die der Spalte 5 halbiert werden.

+) abgeschätzt

++) bei einem geschätzten Titer von 10⁷ Zellen/ml

24) In Tabelle 5 ist dieser Wert als Vergleich zu den Wachstumswärmen aufgeführt.

den Werten in Spalte 4 ist zu bedenken, daß die Stoffwechselleistungen von der Größe der Zellen, d.h. ihrem Ploidiegrad abhängig sind. Käufliche Bäckerhefe liegt zum überwiegenden Teil tetraploid vor, während der in dieser Arbeit am meisten benutzte Stamm 211 diploid ist.

In der Anfangsphase des Betriebsstoffwechsels ist ein deutliches Maximum der Wärmeentwicklung zu beobachten (Abb. 23). Für die Annahme, daß diese Anfangsenergie mit dem Auffüllen von Depots in der Zelle zusammenhängt, die während der stationären Phase der Vorkultur angegriffen wurden, sprechen folgende Ergebnisse:

- a) Sowohl im Medium Q/4 als auch in reinem Puffer, in denen nur ein endogener Stoffwechsel möglich ist, fehlt das Anfangsmaximum vollständig. Das Thermogramm besteht aus einer Parallelen zur Zeitachse.
- b) Bringt man Zellen aus der log-Phase, in der die Depots aufgefüllt sein dürften, in Glucose-Puffer, so ist das Maximum wesentlich geringer, wenn auch noch schwach angedeutet.
- c) Nach Bestrahlung der Zellen ist das Maximum genau so vorhanden wie bei normalem Energiestoffwechsel.
- d) Der Umwandlungsquotient für diesen Teil des Thermogrammes stimmt mit dem überein, der sich beim Wachstum von Zellen in Minimalmedium ergibt (Tab. 5).

POHLIT und Mit. (1966) stellen fest, daß bei Wachstum von diploiden Hefen in Medien verschiedener Glucose-Konzentration $4,7 \cdot 10^{-5}$ g Glucose/ml nicht für die Bildung neuer Zellen verwertet werden. Teilt man diesen Wert durch den Anfangstiter, so erhält man einen Anteil von $0,6 \cdot 10^{-11}$ g Glucose/Zelle (entsprechend 10 % des Glucoseverbrauches zum Aufbau einer neuen Zelle), der nach Meinung der Autoren als Speicherstoffe angelegt wird.

Experimenten von VAN NIEL und ANDERSON (1941) kann man entnehmen, daß bei der Glucose-Fermentierung die Zellen eine Gewichtszunahme von 8,4 bis 20,4 % zeigen, die auf eine Auffüllung von Depots zurückzuführen ist. Aus diesen Angaben läßt sich eine Glucose-Speicherung von $0,1 \cdot 10^{-11}$ bis $0,3 \cdot 10^{-11}$ g/Zelle abschätzen.

Bei rund $0,9 \cdot 10^{-8}$ cal/Zelle für das Anfangsmaximum (7.10), einem Umwandlungsquotienten $q = 22,2$ kcal/Mol Glucose und der Annahme, daß 10 % der

Kohlenstoffatome in die Zelle eingebaut werden (8.2), ergeben einige Messungen eine Speicherung von $0,4 \cdot 10^{-11}$ g Glucose/Zelle.

Diese Beobachtungen und Abschätzungen sind mit der Annahme verträglich, daß die im Maximum des Thermogrammes für Betriebsstoffwechsel zum Ausdruck kommende Wärmeentwicklung auf Speichervorgänge in der Zelle zurückzuführen ist, die etwa mit dem Aufbau von Glykogen aus Glucose zusammenhängen dürfte.

Die Thermogramme des Betriebsstoffwechsels nach Bestrahlung unterscheiden sich nicht von denen ohne Bestrahlung. Dieses Ergebnis läßt sich so deuten, daß evtl. ablaufende Reparaturprozesse von einer so schwachen Wärmeentwicklung begleitet sind, daß sie gegenüber der Wärmeabgabe beim Bilden von Depotstoffen nicht zu beobachten ist.

Wie die Zunahme von N_{∞} mit steigenden K_0 -Werten zeigt (Abb. 17), kann die Glucose des Mediums und nicht (nur) ein in der Vorkultur aerob aufgebauter Energievorrat der Zellen des Okulates zum anaeroben Wachstum ausgenutzt werden.

Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der Vermutung einiger Autoren (HEFEN, Bd. I, S. 254), daß unter streng anaeroben Bedingungen überhaupt kein Wachstum möglich, d.h. aus der Gärung keine Wachstumsenergie zu gewinnen sei. Man finde zwar bei manchen Kulturgärhefen ein 8 bis 9 Generationen, bei atmungsfreudigeren Bäckerei-Preßhefen ein 4 bis 5 Generationen umfassendes Wachstum, das aber auf einen aerob aufgebauten Energievorrat zurückzuführen sei, der für ein anfängliches anaerobes Wachstum ausreiche.

Ein solcher aerob aufgebauter Energievorrat ist aber nur durch das Okulat in das System zu bringen. Da stets mit gleichem Titer beimpft wird, müßte dieser pool in allen Versuchen konstant sein. Daraus folgt, daß unabhängig von der Glucose-Konzentration des Mediums immer derselbe Zellendtitel erreicht werden sollte. Gerade das lineare Anwachsen von N_{∞} bei geringen K_0 -Werten (Abb. 17 und Gl. 17) zeigt, daß die Vermutungen dieser Autoren nicht richtig sein können.

Zum Abschluß sei auf die Feststellung von FORREST und Mit. (1961) verwiesen, daß geringe und unerwartete Nebenreaktionen die gesamte Wärmeenergie entscheidend verändern können und daß es daher nicht immer möglich sei, die insgesamt abgegebene Wärme mit thermodynamischen Daten zu vergleichen.

8.4 Energieabgabe pro Einzelzelle

Wegen der Kleinheit der Effekte ist es unmöglich, die Wärmeabgabe pro Einzelzelle direkt zu messen. Alle Angaben wurden daher als Quotient aus gesamter Wärme E und Endtiter N_{∞} gewonnen. Da die Bestimmung des Zelltiters mit Fehlern behaftet bzw. nicht unbedingt dem gesamten Zellvolumen proportional ist (§.8.2), zeigen auch die e - und $\bar{e}$ -Werte erhebliche Streuungen.

Wenn der Zellendtiter N_{∞} ebenso wie die Gesamtwärme E linear mit der Glucose-Konzentration K_0 wüchse (7.7), wäre $e = E/N_{\infty}$ konstant und würde sich nur als Abflachung der Gerade $E = \alpha K_0$ bemerkbar machen, da von der jeweils möglichen Energie noch die in den gebildeten Zellen gespeicherte Energie abzuziehen wäre. Stattdessen beobachtet man ein lineares Anwachsen der pro Zelle freiwerdenden Wärme mit der Glucose-Konzentration: ein immer größerer Teil der freien Enthalpie der Glucose wird als Wärme an das Medium abgegeben und immer weniger als Zellmaterial gespeichert.

Beim Übergang von Minimal- zu Vollmedium (7.8) ergibt sich eine Abnahme der e -Werte mit steigender Aminosäuren-Konzentration. Dieses Verhalten ist nach folgender groben Abschätzung plausibel: Die Trockensubstanz von Hefen enthält rund 8,5 % Stickstoff (im wesentlichen in den Aminosäuren), während für die in Hefen am häufigsten vorkommenden Aminosäuren mit 14 % Stickstoff im Gesamtgewicht gerechnet werden kann (HEFEN, Bd. 1, S. 387 ff.). Die Bildungsenthalpie beträgt gemittelt etwa

$$1,5 \text{ kcal/g Aminosäure.}$$

Bei einem Trockengewicht von $14,4 \cdot 10^{-12}$ g pro diploide Zelle ergibt sich damit eine Enthalpie von

$$\frac{14,4 \cdot 10^{-12} \cdot 0,085 \cdot 1,5 \cdot 10^3}{0,14} = 1,3 \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle}$$

und mit einem Wirkungsgrad von ca. 40 % eine Wärmeabgabe von

$$2,1 \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle,}$$

die beim Wachstum in aminosäurefreiem Minimalmedium zusätzlich auftreten muß. Damit ist die in Tab. 4 auftretende Differenz zum größten Teil erklärt, wenn man die Ungenauigkeit in der Ermittlung von N_{∞} berücksichtigt.

Für den Anfangsteil des Betriebsstoffwechsels, der sich als Depotbildung deuten ließ (7.10 und 8.3), findet man eine Wärmeentwicklung von

$$(0,88 \pm 0,08) \cdot 10^{-8} \text{ cal/Zelle}$$

gegenüber $5,4 \cdot 10^{-8}$ cal/Zelle bei Wachstum in Minimalmedium entsprechender Glucose-Konzentration, d.h. rund 16 % der Energie, die für den Aufbau einer neuen Zelle benötigt wird. Dieser Wert verträgt sich mit den obigen Angaben von POHLIT und Mit. (1966) und VAN NIEL und ANDERSON (1941), die ca. 10 bis 20 % Glucosespeicherung annahmen (§.8.3).

Tabelle 8

ABHÄNGIGKEIT DER WÄRMEENTWICKLUNG PRO ZELLE BEI BETRIEBS-STOFFWECHSEL VOM PLOIDIEGRAD DER HEFEN

Stamm	Ploidiegrad	Maximum 10^{-11} cal/h.Zelle	Endausschlag 10^{-11} cal/h.Zelle
211-1aM	haploid	80	35
211	diploid	200	90

Tabelle 8 gibt die Wärmeentwicklung pro Zeit und pro Zelle im Maximum und in der konstanten Phase ("Endausschlag") des Betriebsstoffwechsels wieder. Im Vergleich dazu ist die Wärmeabgabe/h.Zelle bei anaerobem Wachstum des Stammes 211 in Minimalmedium gleicher Glucose-Konzentration $690 \cdot 10^{-11}$ cal/h.Zelle (7.7) der Endausschlag in Puffer oder einem glucosefreiem Medium 0/4 5 bis $10 \cdot 10^{-11}$ cal/h.Zelle.

Die Tatsache, daß der Bau- und Energiestoffwechsel pro Zelle mit dem Ploidiegrad wächst (s.z.B. POHLIT und Mit. 1966), findet sich in den Daten der Tab. 8 bestätigt.

Aus dem Endausschlag $90 \cdot 10^{-11}$ cal/h.Zelle des Stammes 211 läßt sich bei einem Trockengewicht von $14,4 \cdot 10^{-12}$ g/Zelle eine Wärmeerzeugung von

$$1,1 \text{ cal/min.g Trockengewicht}$$

berechnen, der ein Wert von

2,8 cal/min.g Trockengewicht

bei Fermentierung durch *S. faecalis* gegenübersteht (FORREST und Mit. 1961).

Wird die Energieentwicklung pro Einzelzelle bei verschiedenen Wachstumstemperaturen untersucht (7.13), so zeigt sich ein leichter Anstieg mit zunehmender Temperatur (Gl. (30)): höhere Temperaturen sind thermodynamisch ungünstiger, da die Prozesse schneller ablaufen und sich weiter von der reversiblen Versuchsführung entfernen.

8.5 Geschwindigkeitskonstanten

Unter 8.1 und in A 1, Abb. 34, wird gezeigt, daß für alle untersuchten Glucosekonzentrationen die Wärmeabgabe weitgehend dem logistischen Ansatz folgt. Daher kann man aus der insgesamt freigesetzten Wärme E und der maximalen Wärmeerzeugung $E_{\max}$ die Geschwindigkeitskonstante k der logarithmischen Phase errechnen (s. A1):

$$k = 4 \frac{E_{\max}}{E}.$$

Mit den Gleichungen (13) und (20) erhält man

$$k = \frac{2,00 K_0 + 0,66}{0,44 \cdot K_0^2 + 2,54 \cdot K_0 + 3,69} h^{-1}. \quad (42)$$

Auch bei einer Glucose-Konzentration $K_0 = 0$ beobachtet man eine Wärmeentwicklung, die auf den endogenen Stoffwechsel in den Zellen, nicht aber auf den Glucose-Umsatz im Medium zurückzuführen ist. Diese Energieabgabe wird in Gl. (42) durch das additive Glied "0,66" berücksichtigt. Wenn die Abhängigkeit des Umsatzes von der Glucose-Konzentration untersucht wird, muß das additive Glied fortfallen. Damit ergibt sich für die Geschwindigkeitskonstante k nach kurzer Umformung

$$k = \frac{K_0}{0,22 \cdot K_0^2 + 1,27 \cdot K_0 + 1,85} h^{-1}. \quad (43)$$

Abb. 31 zeigt den Verlauf von k in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration K_0 .

Bei Fermentreaktionen kann eine Hemmung durch Substratüberschuß auftreten, weil neben einem aktiven auch ein blockierender inaktiver Enzym-Substrat-Komplex

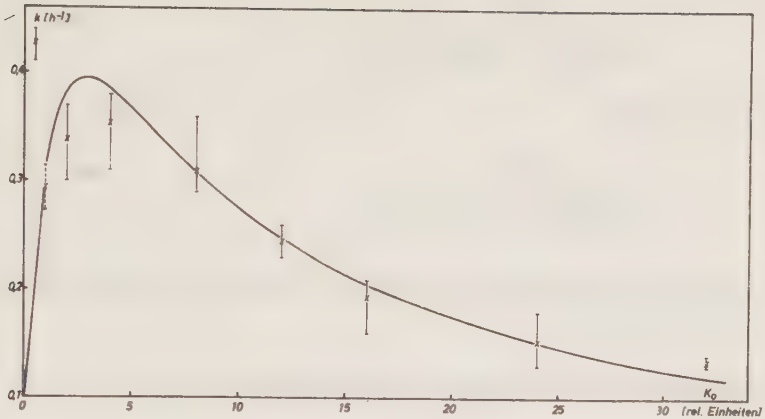


Abb. 31 Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k der Wärmeabgabe von der Glucose-Konzentration K_0 . Alle weiteren Angaben wie in Abb. 16.

gebildet wird²⁵⁾. Treten die Substratmoleküle mit n Orten am Enzym in Wechselwirkung, so gilt für die Umsetzungsgeschwindigkeit v des Komplexes in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$

$$v = \frac{[S]}{\frac{[S]^{1+n}}{K_i} + [S] + K_m} V \quad h^{-1} \quad (44)$$

Darin bedeuten V die maximale Geschwindigkeit der ungehemmten Reaktion, K_m die Gleichgewichtskonstante der Fermentreaktion, K_i die der hemmenden Reaktion. $[S]$ ist angegeben in Mol/Liter. Ersetzt man in Gl. (43) k durch v und K_0 durch $[S]$ nach

$$K_0 = 1 / (8,4 \cdot 10^{-3}) \cdot [S] = 119 [S] \quad (\text{s. 7.7}), \quad (45)$$

25) s. z. B. NETTER (1959), S. 583 ff

so ergibt sich nach leichter Umformung

$$v = \frac{[S]}{26,2 [S]^2 + 1,27[S] + 0,016} \quad h^{-1} \quad (46)$$

und aus Gl. (44)

$$v = \frac{[S]}{\frac{[S]^{1+n}}{K_i \cdot V} + \frac{[S]}{V} + \frac{K_m}{V}} \quad h^{-1} \quad (47)$$

Die Gleichungen (46) und (47) entsprechen sich, wenn man einen Wirkort am Ferment ($n = 1$) annimmt.

Durch Vergleich der Koeffizienten in Gl. (46) und Gl. (47) folgt

$$\begin{aligned} V &= 0,79 \quad h^{-1} \\ K_i &= 0,048 \text{ Mol/Liter} \\ K_m &= 0,012 \text{ Mol/Liter} . \end{aligned}$$

Der Verlauf der in Abb. 31 dargestellten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten als Funktion der Glucose-Konzentration läßt sich also als der einer Fermenthemmung durch Substratüberschuß deuten.

Sucht man in der Literatur nach K_m -Werten, die dem ermittelten $K_m = 0,012 \text{ Mol/Liter}$ etwa entsprechen, so findet man

$$K_m = 0,018 \text{ Mol/Liter} \quad (\text{pH} = 7,6)$$

von Alkoholdehydrogenase ²⁶⁾, die im letzten Schritt der alkoholischen Gärung Acetaldehyd zu Äthylalkohol reduziert und das oxidierte (aktive) Nicotinamid-adenin-dinucleotid NAD^+ für den neuerlichen Ablauf der Reaktion zur Verfügung stellt. Die Abweichung von dem in der Literatur angegebenen Wert ließe sich aus dem unterschiedlichen pH-Wert der Medien erklären.

26) s. NETTER (1959), S. 571

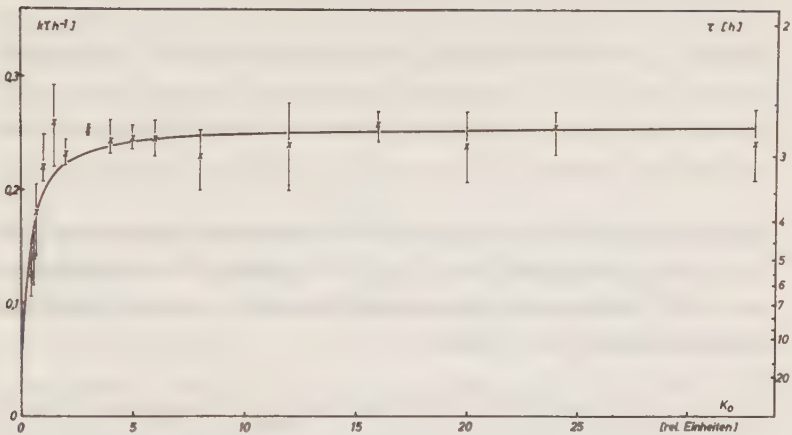


Abb. 32 Geschwindigkeitskonstante k' des Wachstums bzw. Zellzyklusdauer τ als Funktion der Glucose-Konzentration K_0 . Alle weiteren Angaben wie in Abb. 16.

Um zu zeigen, daß sich die durch Gl. (43) gegebene Geschwindigkeitskonstante k zunächst nur auf den Energieumsatz und nicht auf das Wachstum bezieht, wurden im gleichen Konzentrationsbereich Wachstumskurven kolorimetrisch aufgenommen und aus der logarithmischen Phase die Geschwindigkeitskonstante k' des Wachstums ermittelt ²⁷⁾.

Wie MONOD (1942) bei *B. coli*, so beobachtet man auch bei Hefen einen sehr steilen Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten k' mit zunehmender Glucose-Konzentration und ein Abknicken in einen stationären Wert (Abb. 32). Der Anfangsanstieg entspricht ziemlich genau dem der Kurve in Abb. 31. Das kann als Hinweis darauf dienen, daß in diesem Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen

- (a) Glucose-Angebot und Wachstumsgeschwindigkeit bzw. Energieumsatz und deshalb
- (b) Wachstum und Wärmeabgabe

besteht, wie er sich in Abb. 11 zeigt und auch von BELAICH (1963) für *P. lindneri*

²⁷⁾ Versuche wie in 7.13.2

bei kleinen Glucose-Konzentrationen beschrieben wurde.

WINZLER und BAUMBERGER (1938) geben für Hefen eine kritische Glucose-Konzentration von $2,25 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter an, oberhalb deren die Geschwindigkeit der Wärmeerzeugung von K_0 unabhängig ist, während sie unterhalb des kritischen Wertes linear mit K_0 wächst.

Sucht man in Abb. 32 den Schnitt zwischen Anfangstangente und Maximalwert der Geschwindigkeitskonstanten, so erhält man eine zugehörige Glucose-Konzentration von $3,7 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter, die größenordnungsmäßig mit dem Wert von WINZLER und BAUMBERGER (1938) übereinstimmt.

Der Unterschied in den Geschwindigkeitskonstanten der Wärmeerzeugung (Abb. 31) und des Wachstums (Abb. 32) läßt sich aus dem Umstand erklären, daß bei den Trübungsmessungen (Wachstum) das Medium gerührt wird und die Zellen homogen im ganzen Volumen verteilt sind, während sie beim Wachstum im Kalorimeter am Boden liegen. Der bei der Fermentierung entstehende Alkohol könnte sich in einer bodennahen Schicht anreichern und zu einer Substrathemmung der Alkoholdehydrogenase führen, die umso stärker ist, je mehr Alkohol produziert wird, d.h. je größer die anfängliche Glucose-Konzentration K_0 ist.

8.6 Ermittlung der Aktivierungsgrößen

Nach A2 können die Aktivierungsenthalpie ΔH^+ , die Aktivierungsentropie ΔS^+ und die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^+ aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k ermittelt werden. Ausgehend von der reaktionskinetischen Grundgleichung

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta H^+}{RT}} + \frac{\Delta S^+}{R}$$

erhält man durch dekadisches Logarithmieren

$$\log k = \log (k_B T/h) + \Delta S^+ / (2,3 \cdot R) - \Delta H^+ / (2,3 \cdot R) \cdot \frac{1}{T} \quad (48)$$

(k_B = Boltzmann-Konstante, h = Plancksches Wirkungsquantum, R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur). Für den meist engen untersuchten Temperaturbereich kann

man $\log (kT/h) = \text{const}$ setzen, so daß $\log k$ eine lineare Funktion von $1/T$ wird. Aus der Geradensteigung ist ΔH^+ , aus dem Ordinatenabschnitt ΔS^+ und aus beiden nach

$$\Delta G^+ = \Delta H^+ - T \cdot \Delta S^+$$

die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^+ zu ermitteln.

Nach Gl. (48) können aus den unter 7.13 angegebenen Temperaturabhängigkeiten verschiedener Geschwindigkeitskonstanten die Aktivierungsgrößen gewonnen werden. Ihre Werte sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Allerdings mitteln diese Geschwindigkeitskonstanten, wie schon in der Einleitung (s. 1.1) betont wurde, über verschiedene Teilreaktionen und sind daher als integrale Größen nur schwer bestimmten Syntheseschritten zuzuordnen. Um auch die Temperaturabhängigkeit der Wärmeabgabe pro Einzelzelle auswerten zu können, muß eine Umrechnung vorgenommen werden:

Der Mittelwert der Temperatur im untersuchten Bereich (19 bis 33° C) beträgt 26° C, ihm entspricht nach Gl. (30) eine Wärmeabgabe $e = 2,6 \cdot 10^{-8}$ cal/Zelle. Damit folgt aus

$$\log \dot{e} = \log e/\tau = \log 2,6 \cdot 10^{-8} + \log 1/\tau = -7,59 + \log 1/\tau$$

mit Gl. (37)

$$\begin{aligned} \log 1/\tau &= \log e + 7,59 = -3,07 \cdot 10^3 \frac{1}{T} + 1,81 + 7,59 \\ &= -3,07 \cdot 10^3 \frac{1}{T} + 9,40. \end{aligned} \quad (49)$$

Dabei ist τ die Zeit, in der die Wärme $e = 2,6 \cdot 10^{-8}$ cal/Zelle abgegeben wird.

Aus Tab. 9 kann man entnehmen, daß die gewonnenen ΔH^+ und ΔS^+ -Werte stärkere Schwankungen aufweisen, daß dagegen ΔG^+ konstant ist.

Nach NETTER (1959, S. 564 ff.) muß man in der Deutung der gefundenen Aktivierungsgrößen sehr vorsichtig sein, da die für Gase gültigen Gleichungen nicht ohne weiteres auf wässrige Lösungen und heterogene Systeme übertragen werden dürfen. Sicher kann der ΔS^+ -Wert nicht mit den in A5 abgeschätzten Zellentropien verglichen werden, auch wenn man von der Schwierigkeit, ein Mol Zellen zu definieren, absieht.

Den in Tab. 9 wiedergegebenen Größen sollen Werte gegenübergestellt werden, die aus Angaben von REICHERT (1969) über das Wachstum von 4 Mutanten von

Tabelle 9

AKTIVIERUNGSGRÖSSEN DES ANAEROBEN WACHSTUMS UND
DER GLUCOSE-FERMENTIERUNG VON *S.CEREVISIAE*

Versuch	Gleichung	ΔH^+ kcal/Mol	ΔS^+ cal/°Mol	ΔG^+ kcal/Mol
Kalorimeter				
nach $k = 4E_{\max}^0/E$	(32)	+ 8,6	- 48,9	+ 23,4
aus $\dot{e}$	(49)	+ 14,0	- 31,8	+ 23,6
Trübungsmessung				
5 Kammern	(38)	+ 14,3	- 30,9	+ 23,7
Kontinuierlich	(39)	+ 19,5	- 12,3	+ 23,2
im Mittel		+ 14,1	- 31,0	+ 23,5
Betriebsstoffwechsel	(40)	+ 18,3	- 23,8	+ 25,5

S.cerevisiae gewonnen wurden, welche die Adeninsynthese (ad_2 -Locu s) betreffen (Tab. 10). Diese sich aus dem Stamm 211 ableitenden tetraploiden Stämme wurden in Petrischalen auf Agarmedium gezüchtet und ihr Wachstum durch Trübungsmessung verfolgt. Auch hier zeigt sich bei stärkeren Schwankungen der ΔH^+ - und ΔS^+ -Werte eine sehr große Konstanz der ΔG^+ -Werte und eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Tab. 9.

Andererseits kann man aus Literaturangaben (PRECHT, CHRISTOPHERSEN und HENSEL 1955, ROSE 1967) über die Temperaturabhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit für 5 verschiedene Mikroorganismen freie Aktivierungsenthalpien ΔG^+ errechnen, die einen Mittelwert

$$\Delta G^+ = + 23,1 \pm 1,3 \text{ kcal/Mol}$$

haben. Aber auch andere biologische Vorgänge wie der Sauerstoffverbrauch von Hamster und Ratte oder die Herzfrequenz der Maus (PRECHT, CHRISTOPHERSEN und HENSEL 1955) zeigen ΔG^+ -Werte, die im Bereich von + 20 bis + 25 kcal/Mol liegen.

Tabelle 10

AKTIVIERUNGSGRÖSSEN DES AGARWACHSTUMS VON
S. CEREVISIAE-MUTANTEN (NACH ANGABEN VON
REICHERT (1969) BERECHNET)

Genotyp	ΔH^+ kcal/Mol	ΔS^+ cal/°Mol	ΔG^+ kcal / Mol
tttt	+ 14,5	- 29,1	+ 23,3
++++	+ 10,4	- 42,5	+ 23,3
ssstttt	+ 17,5	- 19,9	+ 23,5
++oo	+ 10,8	- 41,5	+ 23,4

t = temperatursensibel; + = "Wildtyp"; s = Temperatursensibilität supprimiert; o = vollständig blockiert

9. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Aufgabe der hier vorgelegten Untersuchung war, thermodynamische Daten zum Stoffwechsel von Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) zu gewinnen. Im einzelnen wurden folgende Probleme analysiert:

- (1) Ermittlung der günstigsten technischen Bedingungen bei der Arbeit mit dem Mikrokalorimeter E. Calvet.
- (2) Es zeigt sich, daß Rühren und Belüften des Mediums im Kalorimeter mit sehr großen Schwierigkeiten verbunden sind, da sie zu Wärmen in der Größenordnung der Wachstumswärme führen. Doch läßt sich nachweisen, daß bei anaeroben Bedingungen mit und ohne Rühren nur die Geschwindigkeitskonstanten verändert werden.
- (3) Zwischen Glucoseverbrauch und Wärmeentwicklung besteht eine enge Abhängigkeit.
- (4) Die von einem Medium insgesamt abgegebene Wärme ist der Anfangskonzentration der Glucose direkt proportional. Der Proportionalitätsfaktor beträgt 22,3 kcal/Mol Glucose. Die Glucose wird stets vollständig umgesetzt. Die Zahl der gebildeten Zellen, der maximale Wärmefluß und der Wärmefluß pro Zelle zeigen als Funktionen der Glucose-Konzentration ein Sättigungsverhalten.

- (5) Aus den Thermogrammen läßt sich eine Geschwindigkeitskonstante für die Wärmeerzeugung berechnen; ihre Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration entspricht der einer Fermenthemmung durch Substratüberschuß. Die kolorimetrisch ermittelte Konstante der Wachstumsgeschwindigkeit nimmt dagegen für hohe Glucose-Konzentrationen einen Sättigungswert an.
- (6) Beim Übergang von einem Medium ohne Aminosäuren zu einem Vollmedium mit ausreichendem Aminosäurenangebot und gleicher Glucose-Konzentration bleibt die insgesamt entwickelte Wärme konstant, während die Wärmeproduktion pro Zelle abnimmt.
- (7) Die Thermogramme von Zellen auf einem festen Agarmedium unterscheiden sich deutlich von denen im flüssigen Medium. Der Abfall nach Erreichen des maximalen Wärmeflusses ist sehr schroff, doch geht der Ausschlag meist nicht auf Null zurück. Es bleibt eine von der Zellkonzentration unabhängige Wärmeerzeugung, deren Ursprung noch nicht geklärt ist.
- (8) Zellen, die aus der stationären Phase in Glucose-Puffer überimpft werden, haben ein starkes Anfangsmaximum der Wärmeerzeugung. Es dürfte mit dem Auffüllen von Depots zusammenhängen, da Zellen aus der logarithmischen Phase sofort einen auf lange Zeit konstanten Wert der Wärmeproduktion annehmen.
- (9) Orientierende Versuche zum Stoffwechsel nach Bestrahlung zeigen, daß die abgegebene Wärme unabhängig von der Bestrahlung ist. Die Wachstumskurven verändern ihre Form nicht, wenn von einem geringen Anfangstiter ($3 \cdot 10^5$ Zellen / ml) ausgegangen wird, doch verlängert sich die Zeit bis zum Beginn der logarithmischen Phase mit zunehmender Dosis.
- (10) Aus Messungen der Temperaturabhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit (kolorimetrisch) und der Umsatzgeschwindigkeit (kalorimetrisch und mit einem Warburg-Apparat ermittelt) lassen sich Aktivierungsgrößen berechnen. Die nach diesen 3 Methoden gewonnenen Werte der freien Enthalpie der Aktivierung liegen eng beieinander, die anderen Aktivierungsgrößen zeigen Abweichungen.
- (11) Auf verschiedenen Wegen wird die Entropie der Zellbildung berechnet und mit den Daten verglichen, die sich aus den Messungen ergeben. Man findet Werte von $-4,1$ bis $-14,9 \cdot 10^{-12}$ cal/° Zelle. Die Entropie des abgeschlossenen Systems Wachstumskammer + Thermostat ist in Übereinstimmung

mit dem II. Hauptsatz der Thermodynamik stets positiv.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß das Mikrokalorimeter E. Calvet für thermodynamische Messungen bei langsam ablaufenden Prozessen sehr geeignet ist.

Grobe Abschätzungen lehren, daß die durch genetische Methoden nachzuweisenden Reparaturen von Strahlenschäden mit einer so kleinen Wärmeabgabe verlaufen, daß ihr Nachweis gegenüber dem endogenen Stoffwechsel von rund 10^{-8} cal/Zelle kaum gelingen dürfte. Eher ist zu erwarten, daß sich nach Bestrahlung eine gesteigerte Proteinsynthese in einem zusätzlichen Wärmefluß bemerkbar macht.

Wenn es gelingt, das Mikrokalorimeter so mit einem Chemostaten oder Turbidostaten zu koppeln, daß in der Reaktionskammer eine kontinuierliche Kultur einzustellen ist, dann könnte die Wärmeproduktion im Fließgleichgewicht der Population als Funktion der Zeit untersucht werden. Nach den Vorhersagen von PRIGOGINE (1955), DE GROOT (1960) und PRIGOGINE und WIAME (1946) sollte im Fließgleichgewicht ein Zustand minimaler Entropieerzeugung, d. h. hier minimaler Wärmeabgabe angenommen werden. Erste Ergebnisse von STOWARD (1962) in dieser Richtung scheinen nicht beweiskräftig zu sein.

A 1 Die logistische Funktion

Das Wachstum einer Zellkultur in einem Medium mit Glucose als begrenzendem Faktor läßt sich in der log- und der stationären Phase durch die logistische Funktion wiedergeben. Zu ihr gelangt man von dem Ansatz:

$$\dot{N} = \frac{dN}{dt} = (k - m \cdot N) \cdot N \quad (50)$$

für die Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{N}$, wenn N die Zahl der zur Zeit t vorhandenen Zellen ist und k und m Konstanten darstellen. Durch Integration findet man

$$N(t) = \frac{k N_0 e^{kt}}{k + m N_0 (e^{kt} - 1)} \quad (51)$$

($N_0 = N(t=0)$ = Anfangstiter). Diese Gleichung heißt logistische Funktion oder Gleichung von VERHULST-PEARL. Für wachsendes t geht sie gegen den Grenzwert

$$\lim N = k/m = N_{\infty} \quad (52)$$

Die Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{N}$ hat ein Maximum an der Stelle

$$N_{\max} = k/2m = 1/2 \cdot N_{\infty} \quad (53)$$

der Größe

$$\dot{N}_{\max} = k^2/4m \quad (54)$$

Dieses Maximum ist zugleich Wendepunkt der Stammfunktion $N = N(t)$. Wird die Wachstumskurve wie üblich halblogarithmisch aufgetragen, so bleibt die typisch sigmoide Form erhalten, doch verschiebt sich die Lage des Wendepunktes (wie für alle reellen Funktionen) in Richtung auf kleinere N -Werte²⁸⁾.

Geht man von der Annahme aus, daß die Energieabgabe pro Zelle während des ganzen Wachstums der Population konstant ist, so kann man in der logistischen Funktion

28) Daraus erklärt sich z.B. die Feststellung von LOCHMANN, daß in seinen Systemen eine maximale DNS-Synthese kurz nach dem Wendepunkt der log-Phase auftritt (pers.Mitteilung).

den Zelliter $N(t)$ durch die abgegebene Energie $E(t)$ und den Zellzuwachs $\overset{\circ}{N}$ durch die Wärmeerzeugung $\overset{\circ}{E}$ ersetzen. Es entsprechen sich damit

$$N(t) : E(t) \quad \overset{\circ}{N} : \overset{\circ}{E} \quad N_{\infty} : E \quad \overset{\circ}{N}_{\max} : \overset{\circ}{E}_{\max}.$$

Wenn man E und $\overset{\circ}{E}_{\max}$ der vom Kalorimeter gelieferten Kurve entnimmt, kann man aus Gl. (52) und Gl. (54) die beiden Geschwindigkeitskonstanten k und m berechnen:

$$k = 4 \cdot \overset{\circ}{E}_{\max} / E \quad (55)$$

$$m = 4 \cdot \overset{\circ}{E}_{\max} / E^2. \quad (56)$$

Mit Gl. (53) läßt sich prüfen, ob die Annahme der Proportionalität zwischen Energieabgabe und Zellzahl besteht bzw. ob die logistische Funktion die Energieabgabe richtig beschreibt. Nach Gl. (53) muß bis zum Maximum der Energieerzeugung die Hälfte der Gesamtenergie entwickelt worden sein²⁹⁾.

Wandelt man die vom Kalorimeter aufgezeichnete Wärmeerzeugung als Funktion der Zeit $\overset{\circ}{E} = \overset{\circ}{E}(t)$ in eine Funktion der bis zur Zeit t erzeugten Energie $E : \overset{\circ}{E} = \overset{\circ}{E}(E)$ um, so sollte sich nach Gl. (50) eine nach rechts verschobene, nach unten geöffnete Parabel 2. Ordnung ergeben. Ihre Ableitung nach der Energie wäre eine Gerade mit der Steigung $-2m$ und dem Ordinatenabschnitt k . Abb. 33 zeigt den Vergleich zwischen diesem theoretischen und dem experimentellen Ergebnis: Im oberen Feld die vom Kalorimeter geschriebene Kurve $\overset{\circ}{E} = \overset{\circ}{E}(t)$ und die zugehörige Stammfunktion $E(t)$, im mittleren Feld die aus beiden Kurven errechnete "Parabel" $\overset{\circ}{E}(E)$, im unteren Feld deren Ableitung nach der Energie (Kreuze). Entnimmt man diesen Kurven nach Gl. (55) und Gl. (56) die charakteristischen Konstanten k und m der logistischen Funktion, so kann man mit ihnen die theoretische Kurve $\overset{\circ}{E} = \overset{\circ}{E}(t)$ (oberes Feld: Punkte) und die theoretische Gerade $d\overset{\circ}{E}/dE = k - 2m \cdot E$ (unteres Feld: ausgezogene Gerade) berechnen. Es ergibt sich eine befriedigende Übereinstimmung, d.h. die Wärmeentwicklung als Funktion der Zeit läßt sich durch die logistische Funktion beschreiben.

Andererseits kann man aus den Thermogrammen mit Hilfe von Gl. (55) und Gl. (56) k und m ermitteln, nach

29) Der aus 16 Messungen gewonnene Mittelwert des Quotienten $E_{\max}/E$ betrug 0,47 mit Schwankungen zwischen 0,42 und 0,51, während er theoretisch 0,50 sein mußte.

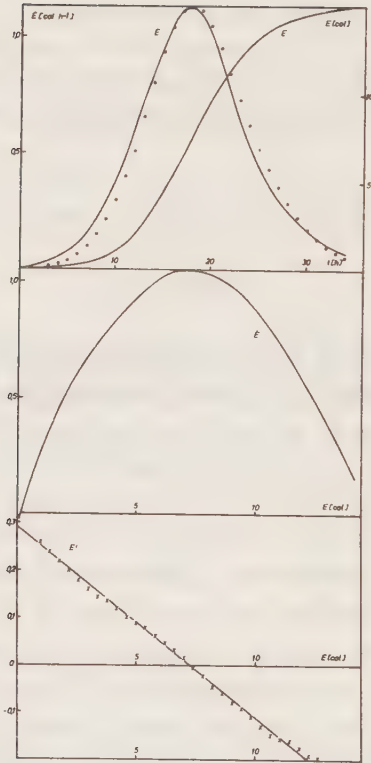


Abb. 33

Verlauf der logistischen Funktion und ihrer verschiedenen Ableitungen. Oben: Die vom Kalorimeter aufgezeichnete Kurve $\bar{E}$, ihre Stammfunktion E und die mit Gl. (55) und Gl. (56) nach Gl. (50) berechnete Ableitung der logistischen Funktion (Punkte). Mitte: $\bar{E}$ als Funktion von E . Unten: Ableitung von $\bar{E} = \bar{E}(E)$ nach E (Kreuze), verglichen mit der theoretischen Ableitung nach Gl. (55) und Gl. (56) (ausgezogene Gerade).

$$E = \frac{k \cdot E_0 \cdot e^{-kt}}{k + m \cdot E_0 (e^{kt} - 1)} \quad (51 a)$$

den zeitlichen Verlauf der Wärmeabgabe berechnen und mit den integrierten Kalorimeterkurven vergleichen. Abb. 34 zeigt für verschiedene Glucose-Konzentrationen die vom Kalorimeter aufgeschriebenen Thermogramme ($\bar{E}$), die integrierten Kurven (E) und die aus dem logistischen Ansatz berechneten Werte ($\square$). Stärkere Differenzen treten nur zu Beginn der Wärmeentwicklung auf, da eigentlich $\Delta N = N(t) - N_0$ proportional zu E ist, ein echtes E_0 also nicht existiert. Der Unterschied verwischt sich mit wachsendem $N(t)$. Logarithmische und stationäre Phase lassen sich gut durch die logistische Funktion annähern.

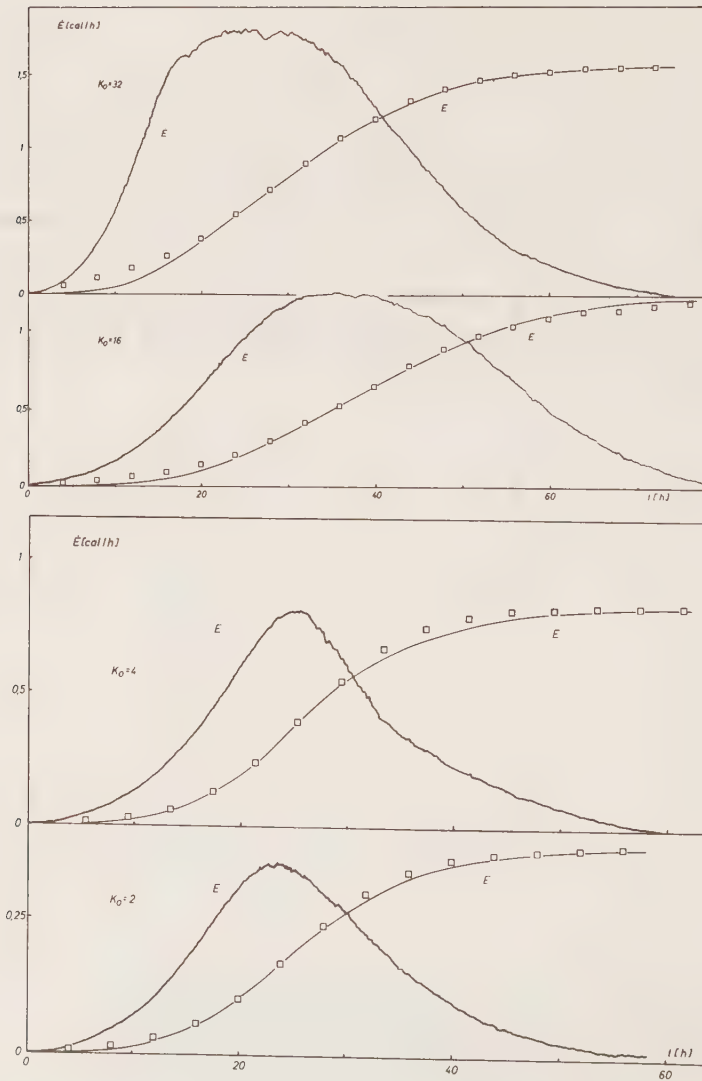


Abb. 34

Vergleich der durch Integration aus den Thermogrammen ($\bar{E}$) gewonnenen Kalorimeterkurven (E) mit dem Verlauf der logistischen Funktion ($\square$) bei den relativen Glucose-Konzentrationen $K_0 \approx 2; 4; 16$ und 32 .

A 2 Reaktionskinetische Gleichung

Nach Arrhenius läßt sich die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k von der Temperatur T (in $^{\circ}\text{K}$) durch die Gleichung

$$\ln k = - \frac{A}{T} + B \quad (57)$$

beschreiben. Darin sind A und B zwei Konstanten, die sich über die Reaktionsisobare mit der Aktivierungswärme und bei einer einfachen Reaktion mit der Gesamtzahl der Molekülstöße in Zusammenhang bringen lassen.

Die Zerfallsgeschwindigkeit eines aktivierten Komplexes kann mit Hilfe der statistischen Mechanik berechnet werden. Diese Geschwindigkeit ist zur Konzentration des Komplexes proportional; die Proportionalität vermittelt der Frequenzfaktor

$$\frac{k \cdot T}{h} \quad (58)$$

(k = Boltzmann-Konstante, h = Plancksches Wirkungsquantum). Da die Konzentration aber von der Gleichgewichtskonstanten K abhängt, für die aus der Thermodynamik die Gleichung

$$\ln K = - \frac{\Delta G}{R \cdot T} = - \frac{\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (59)$$

(R = molare Gaskonstante) bekannt ist, folgt³⁰⁾

$$k = \frac{k \cdot T}{h} e^{-\frac{\Delta G^+}{R T}} = \frac{k \cdot T}{h} e^{-\frac{\Delta H^+}{R T}} e^{\frac{\Delta S^+}{R}} \quad (60)$$

Durch dekadisches Logarithmieren kommt man auf die in dieser Arbeit öfter benutzte Gleichung

$$\log k = \log \frac{k \cdot T}{h} + \frac{\Delta S^+}{2,3 R} - \frac{\Delta H^+}{2,3 R} \cdot \frac{1}{T} \quad (61)$$

30) Das hochgesetzte $^+$ deutet die Aktivierungsgrößen an.

ΔS^+ ist die Aktivierungsentropie, ΔH^+ die Aktivierungsenthalpie.

Der erste Summand der Gleichung (61), d.h. der Logarithmus des Frequenzfaktors, ändert sich sehr viel weniger mit der Temperatur T als der dritte Summand, so daß er in dem engen untersuchten Temperaturbereich als konstant angesehen werden kann³¹⁾.

Trägt man den Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten k über dem Kehrwert der absoluten Temperatur auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung

$$\mu = \frac{\Delta H^+}{2,3 R} \quad (62)$$

und dem Ordinatenabschnitt

$$n = \log \frac{k}{h} + \frac{\Delta S^+}{2,3 R} \quad (63)$$

Aus den Größen μ und n lassen sich damit die Aktivierungsenthalpie ΔH^+ und Aktivierungsentropie ΔS^+ und aus ihnen über

$$\Delta G^+ = \Delta H^+ - T \cdot \Delta S^+$$

die freie Aktivierungsenergie ΔG^+ berechnen.

Auf die Problematik des Frequenzfaktors und auf die stillschweigende Übereinkunft, den schwer abschätzbaren Transmissionskoeffizienten κ gleich 1 zu setzen, soll hier nicht weiter eingegangen werden (s. aber STEARN und EYRING 1937, EYRING und STEARN 1939 und GLASSTONE, LAIDLER und EYRING 1941).

31) Eine Änderung der Temperatur von 30 auf 40° C bedeutet für den Frequenzfaktor eine Zunahme um 3 %, für seinen Logarithmus aber nur um 0,07 %. Diese Änderung ist daher gegenüber der von $1/T$ zu vernachlässigen.

A 3 Abschätzung der Verdunstungswärme

Es soll die Verdunstungswärme abgeschätzt werden, die auftritt, wenn man im Kalorimeter unter aeroben Bedingungen Hefen wachsen läßt.

Der Luftstrom sei etwa

60 Luftperlen/min, Durchmesser 3 mm.

Eine Luftblase hat das Volumen: $V = 0,014 \text{ cm}^3$.

Wasserdampfgehalt der Luft bei 30°C : $30,4 \text{ g/m}^3$.

Verdampfungswärme von Wasser: $539 \text{ kcal/kg} = 539 \text{ cal/g}$.

Eine Luftblase enthält

$$30,4 \cdot 0,014 \cdot 10^{-6} = 4,3 \cdot 10^{-7} \text{ g Wasserdampf.}$$

Dieser Menge Wasserdampf entspricht einer Verdampfungswärme

$$539 \cdot 4,3 \cdot 10^{-7} = 2,3 \cdot 10^{-4} \text{ cal.}$$

Wenn pro min. 60 Luftblasen durchperlen, sind das pro Stunde 3.600 Blasen, die zu einer Abkühlung um

$$3.600 \cdot 2,3 \cdot 10^{-4} = 0,83 \text{ cal/h}$$

führen. Selbst wenn durch Ultraschallung der Luft in Waschflaschen der Luftfeuchtigkeitsgehalt wesentlich gesteigert wird, so daß nur noch 10 % dieser Verdunstungswärme entsteht, so entspräche dieser Wärmeleistung bei der häufig verwendeten Empfindlichkeit "PS" des Kalorimeters ein Ausschlag von 1 cm.

Die Störungen durch die Verdunstungswärme liegen also in der gleichen Größenordnung wie die zu messenden Effekte.

A 4 Die Bedeutung des Zellwassers

Für die Berechnung des Informationsgehaltes oder der Strukturentropie einer Zelle ist die Frage wichtig, welche Bedeutung dem Zellwasser und seinem Aggregatzustand zukommen.

MOROWITZ (1955) führt drei Gründe für die Annahme an, daß die Information in der Trockensubstanz der Zelle gespeichert ist:

- (1) Manche Einzeller überleben ein vollständiges Eintrocknen,
- (2) Lyophilisation entfernt 95 % des nicht gebundenen Zellwassers, ohne zum Zelltod zu führen,
- (3) Zugabe von Wasser zu getrockneten Zellen kann keine Zufuhr von Information bedeuten.

Er berechnet daher den Informationsgehalt der Zelle als Information des Kristallgitters der Trockensubstanz am absoluten Nullpunkt (s. A 6).

Die von einigen Autoren gefundene Abtötung durch Lyophilisation dürfte nach MOOR (1964) auf eine falsche Gefriereschwindigkeit zurückzuführen sein. Langsame Geschwindigkeiten, die zunächst ein Gefrieren extracellulären Wassers und dadurch eine starke Dehydration der Zellen bedingen, und hohe Geschwindigkeiten als Voraussetzung einer Vitrifikation (amorphe Verfestigung des Zytoplasmas) der Zelle geben eine Überlebensrate von fast 100 %. Nur bei mittleren Gefriereschwindigkeiten ist eine Eiskristallbildung im Zytoplasma oder in den Vakuolen zu beobachten, durch welche die Zellen abgetötet werden.

TRINCHER (1965) stellt bei reifen, kernlosen Erythrocyten einen ständigen Verbrauch von Glucose, aber keine Stickstoffaufnahme fest. Der Kohlenstoff der Glucose wird also nicht zum Aufbau einer thermisch stabilen intracellulären Substanz verwendet, sondern die freie Energie der Glucose zur Kompensation einer Wärmeabgabe benutzt. Diese stammt aus dem Zerfall der thermisch labilen Struktur des intracellulären Wassers, das sich nach TRINCHER in einem quasi-kristallinen Zustand befindet.

Diese Ansicht wird gestützt durch eine für die Haemolyse gefundene Aktivierungsentropie, die bis auf das negative Vorzeichen der Standardentropie des Wassers bei

Zimmertemperatur entspricht. Da die Haemolyse im Eindringen von intercellulärem Wasser in die Zelle besteht, kann man diese Entropie dem Übergang von Wasser bei Zimmertemperatur in den Zustand maximaler Ordnung - Eiskristalle am absoluten Nullpunkt - zuschreiben.

Nach TRINCHER dient also der Energiestoffwechsel reifer Erythrocyten nur zur Erhaltung des quasi-kristallinen Zustandes des Zellwassers, während nach BISHOP (1964) die freie Energie zur Erhaltung der Form der Zelle, der Ionenzusammensetzung und des reduzierten Zustandes des Haemoglobins benötigt wird.

Die folgende Abschätzung der Lebensdauer der quasi-kristallinen Zustände gibt daher nur eine untere Grenze wieder.

Nach verschiedenen der Literatur entnommenen Angaben³²⁾ haben reife Erythrocyten eine Glykolyse, der eine Änderung der freien Energie um

$$5 \cdot 10^{-12} \quad \text{cal/h. Zelle}$$

entspricht, während die Schmelzwärme des Wassers

$$80 \quad \text{cal/g Wasser}$$

beträgt. Rechnet man über das Zellvolumen und den Wassergehalt der Erythrocyten den Wert von "cal/h. Zelle" in "cal/h.g Wasser" um, so erhält man

$$0,1 \quad \text{cal/h.g Wasser.}$$

Daraus ergibt sich die mittlere Lebensdauer der quasi-kristallinen Zustände des Zellwassers zu

$$800 \quad \text{Stunden.}$$

Nimmt man an, daß die gewonnene freie Energie noch für andere Prozesse verwertet wird, oder berücksichtigt man einen Wirkungsgrad unter 100 %, so verlängert sich diese Zeit.

Wenn man die gefundenen Werte auf diploide Hefezellen mit einem Wassergehalt von ungefähr

$$30 \cdot 10^{-12} \quad \text{g Wasser/Zelle}$$

32) s. vor allem "The Red Blood Cell" (1964)

überträgt, so findet man einen Energieverbrauch von

$$3 \cdot 10^{-12} \quad \text{cal/h.Zelle,}$$

der gegenüber dem Energiebedarf anderer Vorgänge in der Zelle vernachlässigt werden kann.

Für die Entropie des Zellwassers kann man folgende Abschätzung durchführen: Etwa 10 % des Zellwassers liegen gebunden vor, d.h. seine Beweglichkeit ist gegenüber der des freien Wassers herabgesetzt. Damit muß auch seine Entropie abgenommen haben. Da es schwer ist, einen Entropiewert für das gebundene Wasser anzugeben, macht GORSKI (1966) für seine Abschätzung die Annahme, daß in der Zelle eine dem Übergang Wasser - Eis ($\Delta S = -5 \text{ cal/}^\circ\text{Mol}$ bei 0°C) entsprechende Bindung des Wassers mit einem Zehntel dieser Entropieänderung auftritt:

$$\Delta S' = -0,5 \text{ cal/}^\circ\text{Mol.}$$

Für eine diploide Hefezelle mit $3 \cdot 10^{-12}$ g gebundenem Wasser ergibt sich ein Wert

$$\Delta S' = -0,08 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ\text{Zelle,}$$

der gegenüber den in A 5 errechneten Zellentropien vernachlässigt werden kann³³⁾.

Unter A 5.2.3.1 wird die Strukturentropie einer Zelle abgeschätzt. Berücksichtigt man den gesamten Wassergehalt der Zelle, so ergibt sich eine Strukturentropie

$$-8,6 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ\text{Zelle,}$$

bzw., wenn man nur das gebundene Wasser in Rechnung stellt,

$$-5,2 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ\text{Zelle.}$$

Es sei allerdings noch einmal darauf hingewiesen, daß metabolisch besonders aktive Zellbestandteile gleichzeitig besonders kälteempfindlich sind und daß durch Bildung von Eiskristallen im Zytoplasma oder in den Vakuolen die Zelle abgetötet wird. Das Zellwasser kann sich also nur in einem quasi-kristallinen Zustand befinden.

33) Die von TRINCHER (1965) gefundene Aktivierungsentropie würde es nahelegen, im Gegensatz zu GORSKI die volle Entropieänderung von $-5 \text{ cal/}^\circ\text{Mol}$ für die Berechnung zu wählen. Doch ist auch der dann errechnete Wert noch wesentlich kleiner als die gefundenen Zellentropien.

A 5 Abschätzung des Entropiegehaltes von Hefezellen

Wie schon unter 1.1 ausgeführt wurde, gibt es kein direktes Meßverfahren zur Ermittlung der Entropie einer Reaktion. Erst aus der Kenntnis der Wärmetönung ΔH und der Gleichgewichtskonstanten K läßt sich mit Hilfe der Gleichungen (2) und (3) ΔS aus

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (64)$$

berechnen. Im folgenden soll unter vereinfachenden Bedingungen aus (1) Meßergebnissen und (2) bestimmten Annahmen über den Aufbau der Trockensubstanz von Hefezellen der Entropiegehalt der Hefen gewonnen werden.

A 5.1.1 aus der Wachstumswärme:

Wenn das Wachstum der Zellen reversibel verlief (was trotz der kleinen Geschwindigkeitskonstanten sicher nicht der Fall ist), so wäre die im Kalorimeter gemessene Wärmetönung $\Delta H = Q$ der Entropieänderung ΔS proportional:

$$\Delta H = T \cdot \Delta S. \quad (65)$$

Aus Gl. (13) und Gl. (17) findet man für 10 ml eines Mediums 4/4 eine Wärmetönung von 7,5 cal und einen Zellzuwachs von $2,94 \cdot 10^8$ Zellen. Nach Gl. (65) ist bei $T = 303,3^\circ \text{K}$ ($t = 30^\circ \text{C}$)

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T} = \frac{-7,5}{303,3} = -24,7 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ.$$

Wie in A 6 ausgeführt wird, ist nur die Trockensubstanz (35 %) der Zelle in Rechnung zu stellen, so daß als Entropiegehalt einer Zelle

$$s_Z = - \frac{24,7 \cdot 10^{-3} \cdot 0,35}{2,94 \cdot 10^8} = -29 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ \text{ Zelle}$$

folgt. Dieser Wert der Zellentropie stellt eine obere Grenze für den idealen Fall reversiblen Wachstums dar. Die tatsächlichen Entropiewerte müssen kleiner sein.

A 5.1.2 aus der Verbrennungswärme:

Nach einer Tabelle von WHITE (HEFEN, Bd. I, S. 339; auf 100 % umgerechnet) hat

S. cerevisiae die Zusammensetzung



Für die Verbrennung in reinem Sauerstoff unter hohem Druck kann man die Reaktion



annehmen. Die Verbrennung erfolgt explosionsartig, so daß eine Verbrennungstemperatur von $1.500^\circ C$ ($\approx 1.773^\circ K$) pausibel erscheint. Rechnet man die Tabellenwerken entnommenen Standardentropien S_i^0 der einzelnen Bausteine nach

$$S_i^T = S_i^0 + c_{pi} \cdot \ln (T/298) \quad (66)$$

auf die Temperatur $T = 1.773^\circ K$ um und berücksichtigt die Verbrennungswärme von

$$4.900 \text{ cal/g Trockensubstanz,}$$

so erhält man eine Entropie

$$\Delta S_Z = -1,01 \text{ cal/}^\circ \text{g.}$$

Mit $14,4 \cdot 10^{-12} \text{ g/Zelle}$ ergibt sich als obere Grenze der Zellentropie (bei völlig reversibler Verbrennung)

$$s_Z = -14,5 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ \text{Zelle.}$$

A 5.1.3 aus Standardentropien und Wachstumswärme

Im Medium läuft unter Stickstoff die Vergärung der Glucose nach



ab. Die Wachstumskammern enthalten $0,34 \cdot 10^{-3} \text{ Mol Glucose}$, es entstehen $2,94 \cdot 10^8$ Zellen bei einer Wärmeabgabe von $7,5 \text{ cal}$. Nach Abzug der als Baumaterial verbrauchten Glucose bleiben $0,30 \cdot 10^{-3} \text{ Mol Glucose}$ für die Gärung übrig. Als Stickstoffquelle der Zellen dient Ammoniumsulfat, dessen Standardentropie aus den

Entropien vergleichbarer Verbindungen abgeschätzt wurde. Da Glucose in diesem Medium als begrenzender Faktor anzusehen ist, kann der Stickstoffumsatz aus der Zusammensetzung der Hefe zu ca. $0,01 \cdot 10^{-3}$ Mol Ammoniumsulfat berechnet werden. Die Standardentropien der einzelnen Bausteine betragen (s. LANDOLT-BÖRNSTEIN, für die Glucose wurde ein zusätzlicher Lösungsanteil von $14,3 \text{ cal/}^\circ \text{ Mol}$ in Rechnung gestellt):

S° (Glucose, gelöst)	= $65,0 \text{ cal/}^\circ \text{ Mol}$
S° (Ammoniumsulfat)	= $38 \text{ cal/}^\circ \text{ Mol}$
S° (Äthanol)	= $38,4 \text{ cal/}^\circ \text{ Mol}$
S° (Kohlendioxid)	= $51,1 \text{ cal/}^\circ \text{ Mol}$

Damit ergibt sich eine Entropieänderung:

$$\begin{array}{llll}
 \Delta S^\circ \text{ (Glucose)} & = -0,30 \cdot 10^{-3} \cdot 65,0 & = -19,5 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ \\
 \Delta S^\circ \text{ (Amm.sulfat)} & = -0,01 \cdot 10^{-3} \cdot 38 & = -0,4 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ \\
 \Delta S^\circ \text{ (Äthanol)} & = +0,60 \cdot 10^{-3} \cdot 38,4 & = +23,0 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ \\
 \Delta S^\circ \text{ (Kohlendio.)} & = +0,60 \cdot 10^{-3} \cdot 51,1 & = +30,7 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ \\
 & & \hline
 & & +33,8 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ .
 \end{array}$$

Der Wärmeabgabe von $-7,5 \text{ cal}$ bei einer Temperatur von $303,3^\circ \text{ K}$ entspricht eine Entropieänderung

$$\Delta S = \frac{Q}{T} = \frac{-7,5}{303,3} = -24,7 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ,$$

so daß in der Wachstumskammer eine gesamte Entropieänderung

$$\Delta S_{WK} = (33,8 - 24,7) \cdot 10^{-3} = +9,1 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ$$

zu beobachten ist. Hefen wachsen in dem betrachteten Medium mit einem Wirkungsgrad von etwa 60 %, d.h.

$$-0,60 \cdot 9,1 \cdot 10^{-3} = -5,46 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ$$

können als Negentropie der Zelle ausgenutzt werden. Bei $2,94 \cdot 10^8$ Zellen ergibt sich ein Entropiegehalt einer Einzelzelle von

$$s_Z = -5,46 \cdot 10^{-3} / 2,94 \cdot 10^8 = -18,6 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ \text{ Zelle.}$$

A 5.2.1 über die Photosynthese:

STEIN (1960) berechnet den Entropiegehalt einer Zelle unter der Annahme, daß er sich aus 3 Anteilen zusammensetzt: (a) der Entropieänderung des elementaren Bruttoprozesses der Photosynthese, (b) der Entropieänderung durch Kondensation zu Makromolekülen und (c) der Entropie, die aus der Anordnung der Makromoleküle resultiert. Auf eine diploide Hefezelle übertragen liefert seine Berechnung

$$- 7 \cdot 10^{-12} \text{ cal / } ^\circ \text{ Zelle.}$$

Aus der Rechnung wird deutlich, daß die als biologisch besonders relevant angesehene Ordnung in der DNS mit

$$- 1,4 \cdot 10^{-16} \text{ cal / } ^\circ \text{ Zelle}$$

zur Gesamtentropie der Zelle vernachlässigbar wenig beiträgt ³⁴⁾.

A 5.2.2 auf statistischem Wege:

Für organische Verbindungen, die in Lebewesen vorkommen, dividiert man die Standardentropie durch die Anzahl der C-Atome ³⁵⁾ und erhält daraus eine Entropie pro Mol-Atom. Für einige Verbindungsklassen ergeben sich folgende Mittelwerte (Schwankungen in Klammern):

Zucker	8,06	(7,17 - 8,45)	cal / ° Mol-Atom
Aminosäuren	8,33	(7,9 - 8,7)	cal / ° Mol-Atom
Säuren	9,76	(6,8 - 14,35)	cal / ° Mol-Atom
Basen	4,06	(3,31 - 4,60)	cal / ° Mol-Atom

(GORSKI 1966). Der Mittelwert aus diesen Klassen beträgt 7,5 cal / ° Mol-Atom. Da

34) Zu einer Abschätzung des Informationsgehaltes der DNS der Zelle, der noch um einen Faktor 10 geringer ist, kommt man mittels der von GATLIN (1966) angegebenen Berechnung. Aus der Häufigkeit der 4 verschiedenen Nucleotide in der Hefen-DNS kann man auf die (unbekannten) Nachbarschaftshäufigkeiten schließen und daraus die Information beim Fortschreiten der Markoff-Kette um 1 Element ausrechnen. Multipliziert man diese Information mit der Anzahl der Nucleotide der DNS, so findet man die Gesamtinformation der DNS ($1,9 \cdot 10^{-17} \text{ cal / } ^\circ \text{ Zelle}$).

35) u.U. kann man auch C- und N-Atome gleichsetzen und z.B. bei Aminosäuren durch die Summe aus C- und N-Atomen dividieren.

die Zellen aber überwiegend aus den beiden ersten Gruppen aufgebaut sind, ist der Mittelwert

$$8,2 \text{ cal/}^{\circ} \text{ Mol-Atom}$$

angemessener. Dieser Wert ist allerdings etwas zu hoch, da die Polysaccharide und Polypeptide nicht ganzzahlige Vielfache der Grundentropie besitzen.

Dividiert man diese reduzierte Mol-Entropie durch die Anzahl der Atome pro Mol ($6,023 \cdot 10^{23}$), so erhält man die Entropie pro C- (N-) Atom

$$s_{\text{Atom}}^{\circ} = +1,36 \cdot 10^{-23} \text{ cal/}^{\circ}.$$

Aus dem Trockengewicht der Zellen und ihrer atomaren Zusammensetzung läßt sich dann die statistische Entropie berechnen.

Nach Messungen von LOCHMANN³⁶⁾ beträgt das Trockengewicht von *S.cerevisiae* in Abhängigkeit vom Ploidiegrad P

$$T = 7,2 \cdot 10^{-12} \cdot P \text{ g/Zelle.}$$

Der Zusammensetzung $C_{170}H_{258}O_{88}N_{26}$ von *S.cerevisiae* entsprechen $34,0 \cdot 10^{10}$ C-Atome und $5,2 \cdot 10^{10}$ N-Atome pro Zelle. Damit berechnet sich statistisch die Standardentropie zu

$$s_Z^{\circ} = 39,2 \cdot 10^{10} \cdot 1,36 \cdot 10^{-23} = +5,3 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^{\circ} \text{ Zelle.}$$

Die Zelle wird hier also als organische Verbindung $C_{170}H_{258}O_{88}N_{26}$ behandelt. Alle weiteren Elemente der Zelle (Aschen) können wegen ihres geringen Anteiles vernachlässigt werden.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß Standardentropien per definitionem positive Werte haben.

36) persönliche Mitteilung

A 5.2.3 als Strukturentropie:

GORSKI (1966) beschreibt zwei Wege, die Strukturentropie zu ermitteln.

A 5.2.3.1 Es wird angenommen, daß man die n_C C-Atome, n_H H-Atome, n_O O-Atome, n_N N-Atome und n_W Wassermoleküle der Hefezelle bzw. der Nährlösung in N verschiedenen Weisen in dem aus M Elementarzellen bestehenden Gesamtvolumen der Nährlösung anordnen kann. Von diesen N möglichen Formen sind $r < N$ biologisch relevant. Damit beträgt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der "Hefestruktur"

$$p_Z = r / N. \quad (67)$$

Für den Anfangszustand sei die Wahrscheinlichkeit $p_A = 1$, da das System zu Beginn im chemischen Gleichgewicht ist. Daraus errechnet sich die Entropieänderung bei der Anordnung der zunächst beliebig verteilten Bausteine

$$\Delta S = k \cdot \ln (p_Z / p_A) = -k \cdot \ln (N / r). \quad (68)$$

Nimmt man ferner an, daß $r = 1$ ist, d.h. daß es nur einen biologisch relevanten Zustand gibt, so wird aus Gl. (68)

$$\Delta S = -k \cdot \ln N$$

(k : Boltzmann-Konstante; $\ln$: natürlicher Logarithmus).

N ist als Zahl der möglichen Konfigurationen durch die Permutation der nicht unterscheidbaren n_i Atome der i -ten Art in die M Elementarzellen gegeben

$$N = \frac{M!}{\prod n_i!}.$$

Ist $M = n \approx \sum n_i$ gleich der Summe aller betrachteten Bausteine, so folgt mit Hilfe der Stirlingschen Formel in erster Näherung

$$N = n \cdot \log n - \sum n_i \cdot \log n_i. \quad (69)$$

In Gl. (68) eingesetzt erhält man

$$\Delta S = -k \cdot \ln N = -k \cdot \bar{m} (n \cdot \log n - \sum n_i \cdot \log n_i) \quad (70)$$

($\bar{m}$: Umrechnungsfaktor zwischen dekadischem und natürlichem Logarithmus).

Für eine diploide Hefezelle gelten etwa folgende Atomzahlen:

$$n_C = 34,0 \cdot 10^{10}; \quad n_H = 51,6 \cdot 10^{10}; \quad n_O = 17,6 \cdot 10^{10}; \quad n_N = 5,2 \cdot 10^{10};$$

$n_W = 89,4 \cdot 10^{10}$ und $n = \sum n_i = 197,8 \cdot 10^{10}$, aus denen für die einzelnen Summanden in Gl. (70) folgt:

$$\begin{array}{llll} n \cdot \log n & = & 197,8 \cdot 10^{10} \cdot \log 197,8 \cdot 10^{10} & = & 24,32 \cdot 10^{12} \\ n_C \cdot \log n_C & = & 34,0 \cdot 10^{10} \cdot \log 34,0 \cdot 10^{10} & = & 3,92 \cdot 10^{12} \\ n_H \cdot \log n_H & = & 51,6 \cdot 10^{10} \cdot \log 51,6 \cdot 10^{10} & = & 6,04 \cdot 10^{12} \\ n_O \cdot \log n_O & = & 17,6 \cdot 10^{10} \cdot \log 17,6 \cdot 10^{10} & = & 1,98 \cdot 10^{12} \\ n_N \cdot \log n_N & = & 5,2 \cdot 10^{10} \cdot \log 5,2 \cdot 10^{10} & = & 0,56 \cdot 10^{12} \\ n_W \cdot \log n_W & = & 89,4 \cdot 10^{10} \cdot \log 89,4 \cdot 10^{10} & = & \frac{10,68 \cdot 10^{12}}{23,19 \cdot 10^{12}} \end{array}$$

In Gl. (70) eingesetzt ergibt sich

$$\begin{aligned} \Delta S &= -k \cdot m \cdot (24,32 - 23,19) \cdot 10^{12} = -0,33 \cdot 10^{-23} \cdot 2,30,1,13 \cdot 10^{12} \\ &= -8,6 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ \text{ Zelle.} \end{aligned}$$

A 5.2.3.2 Beim zweiten Verfahren wird wiederum das Volumen der Nährlösung in M Elementarzellen unterteilt, die eine Kantenlänge von einem Atomabstand haben. Zu berechnen ist die Wahrscheinlichkeit, n_C beliebig verteilte Bausteine zu einer Kette bestimmter Form und Länge zu vereinigen.

Wenn n_C die Anzahl der in organisches Material eingebauten C- und N-Atome und M die Gesamtzahl der Volumelemente einer Nährlösung von 10 ml ist, gilt wegen $n_C \ll M$ in guter Annäherung für die Entropie der Kettenbildung

$$\Delta S = -n_C \cdot k \cdot \ln M. \quad (71)$$

Da $n_C, M > 0$, folgt $\Delta S < 0$.

Aus $n_C = 1,15 \cdot 10^{20}$ C- und N-Atomen und $M = 2,74 \cdot 10^{24}$ Volumelementen folgt für Gl. (71)

$$\Delta S = - 21,4 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ.$$

Um die Entropieänderung durch Entstehung von Struktur zu ermitteln, muß die Strukturentropie der Glucose berechnet und von der Strukturentropie der Zellen abgezogen werden:

$$\Delta S (\text{Glucose}) = 1 \cdot k \cdot (\ln 4 - (i-1) \cdot \ln M) \quad (72)$$

(1: Anzahl der Glucoseketten in der Nährlösung, $i = 6$; Zahl der C-Atome pro Kette ($1 \cdot i = n_C$).

$$\Delta S (\text{Glucose}) = - 17,7 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ.$$

Damit findet man eine Abnahme der Strukturentropie

$$\Delta S = - (+ 21,4 - 17,7) \cdot 10^{-3} = - 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ cal/}^\circ$$

für die entstandenen $2,94 \cdot 10^8$ Zellen, auf eine Zelle umgerechnet

$$s_Z = -12,6 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ \text{ Zelle.}$$

A 5.3 Diskussion der Berechnungen:

Mit GORSKI (1966) kann man gegen die Berechnung der Strukturentropie einwenden, daß nicht nur r der N Konfigurationen möglich, sondern eben alle N Anordnungen thermodynamisch gleichwahrscheinlich sind. Dann würde aus $r = N$ mit

$$\Delta S = -k \cdot \ln (N/r) = -k \cdot \ln 1 = 0$$

die Behauptung folgen, daß beim Wachstum von Zellen keine Entropieabnahme auftritt. Die N Konfigurationen haben zwar eine a-priori-Wahrscheinlichkeit, die für alle gleich ist, doch sind bei einer a-posteriori-Betrachtung r Zustände ausgezeichnet, deren Wahrscheinlichkeit in der Strukturentropie abgeschätzt wird, ohne daß

durch ein solches Vorgehen ein vitalistisches Element in die Berechnung hineingetragen würde.

Im Gegensatz zu BATTLE (1960) kann aus den hier gewonnenen Daten nach A.5.1 kein Unterschied in der Entropie gefunden werden, wenn Zellen in Minimal- oder Vollmedium gewachsen sind. Allerdings ist eine geringfügige Differenz in den Verbrennungswärmen zu beobachten, eine größere in der Entropie, die man als obere Grenze aus den Wachstumswärmen in verschiedenen Medien gewinnt.

Aus den ermittelten Daten läßt sich eine Abschätzung für die gesamte Entropieänderung a) in der Wachstumskammer, b) in dem abgeschlossenen System Wachstumskammer + Thermostat gewinnen. Während der II. Hauptsatz der Thermodynamik zu a) keine Aussagen macht, fordert er für b) eine Entropiezunahme.

Die Entropieänderung in der Wachstumskammer setzt sich aus der Änderung der Standardentropie der Nährlösung bei der alkoholischen Gärung, der Standardentropie und der Strukturentropie der gebildeten Zellen und der Entropie zusammen, die mit dem Wärmefluß zwischen Wachstumskammer und Thermostat verbunden ist:

Alkoholische Gärung ³⁷⁾	+38,1.10 ⁻³ cal/°
Standardentropie von 2,94.10 ⁸ Zellen	+ 1,7.10 ⁻³ cal/°
Strukturentropie von 2,94.10 ⁸ Zellen	- 3,7.10 ⁻³ cal/°
Wärmeabgabe an den Thermostaten	- 24,8.10 ⁻³ cal/°
	+11,3.10 ⁻³ cal/°

Demnach ist schon im offenen System der Wachstumskammer der II. Hauptsatz erfüllt. Im abgeschlossenen System Wachstumskammer + Thermostat hebt sich der Wärmefluß heraus, die Entropieänderung beträgt

$$\Delta S_{aS} = +36,1.10^{-3} \text{ cal/}^\circ > 0$$

in Übereinstimmung mit dem II. Hauptsatz der Thermodynamik.

37) Alle Angaben beziehen sich auf den Inhalt der Wachstumskammer von 10 ml.

A 6 Abschätzung des Informationsgehaltes von Hefezellen

Aus Experimenten ist bekannt, daß

- (1) manche Einzeller vollständiges Eintrocknen überleben und daß ihnen Lyophilisation 95 % des Zellwassers entzieht;
- (2) manche Organismen Temperaturen am absoluten Nullpunkt vertragen.

Mit MOROWITZ (1955) muß man daher annehmen, daß das Zellwasser und die Schwingungs- und Rotationszustände keine Information tragen können. Für die Informationsberechnung bleibt also nur

der nicht-wässrige Teil der Zelle am absoluten Nullpunkt.

Wenn von N Möglichkeiten, die Bausteine einer Zelle anzuordnen, r biologisch relevant sind (s. A 5.2.3.1), dann ist bei gleichen a-priori-Wahrscheinlichkeiten der N Zustände die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Zelle

$$p = r / N, \quad (67)$$

d.h. die Entropie s_Z und die Information I_Z einer Zelle

$$s_Z = k \cdot \ln (r/N) = k \cdot \ln r - k \cdot \ln N$$

$$I_Z = {}^2\log N - {}^2\log r.$$

Da aber $r \ll N$ ist, folgt

$$\left. \begin{aligned} s_Z &= -k \cdot \ln N \\ I_Z &= {}^2\log N \end{aligned} \right\} \quad s_Z = -k \cdot I_Z \cdot \ln 2 \quad (73)$$

(${}^2\log N$: Logarithmus dualis von N ; die Information wird in "bit" gemessen).

Das weitere Vorgehen von MOROWITZ (1955) unterscheidet sich von dem GORSKI (1966) in 2 Punkten: (1) zusätzlich zu der Zahl N' der möglichen Konfigurationen, die durch Permutation von n_i nichtunterscheidbaren Atomen in M Elementarzellen gewonnen wird

$$N' = \frac{M!}{\prod n_i!},$$

berechnet er die Möglichkeiten B_i , wie ein Atom der i -ten Art seine Bindungen auf die 6 Nachbarn verteilen kann ($B_H = 6$; $B_O = 21$; $B_N = 56$; $B_C = 120$). n_i Atome der i -ten Art haben $B_i^{n_i}$ Möglichkeiten, alle $M = n = \sum n_i$ Atome

$$B = \prod B_i^{n_i}. \quad (74)$$

(2) das gebundene oder freie Zellwasser wird nach den eingangs gemachten Annahmen im Gegensatz zu der Rechnung unter A 5.2.3.1 nicht berücksichtigt.

Die Zahl der tatsächlichen Zustände ist kleiner als das Produkt $N' \cdot B$. Daraus folgt

$${}^2\log N < {}^2\log N' + {}^2\log B = {}^2\log \frac{M!}{\prod n_i!} + {}^2\log \prod B_i^{n_i}$$

und mit der Stirlingschen Formel

$${}^2\log N < M \cdot {}^2\log M - \sum n_i {}^2\log n_i + \sum n_i {}^2\log B_i. \quad (75)$$

Die weitere Berechnung erfolgt der Einfachheit halber über den dekadischen Logarithmus.

Mit den Werten von A 5.2.3.1 wird

$$\begin{array}{rcl} M \cdot \log M & = & 13,04 \cdot 10^{12} \\ \sum n_i \cdot \log n_i & \approx & 12,50 \cdot 10^{12} \\ \sum n_i \cdot \log B_i & = & 1,43 \cdot 10^{12} \end{array}$$

In Gl. (75) eingesetzt erhält man

$${}^{10}\log N < 13,04 \cdot 10^{12} - 12,50 \cdot 10^{12} + 1,43 \cdot 10^{12} = 1,97 \cdot 10^{12}$$

und daraus durch Übergang zum dualen Logarithmus

$$I_Z = 2 \log N = \frac{10 \log N}{0,301} < \frac{1,97 \cdot 10^{12}}{0,301} = 6,54 \cdot 10^{12} \text{ bits.}$$

Mit diesem Wert der Information findet man eine Entropie

$$S_Z = -k \cdot I_Z \cdot \ln 2 < -3,3 \cdot 10^{-24} \cdot 6,54 \cdot 10^{12} \cdot 0,69 \\ = -14,9 \cdot 10^{-12} \text{ cal/}^\circ \text{ Zelle.}$$

Abschließend seien in Tabelle 11 die in A 5 und A 6 gefundenen Entropiewerte für eine diploide Hefezelle zusammengestellt:

Tabelle 11
ABSCHÄTZUNG DES ENTROPIEGEHALTES VON DIPLOIDEN
HEFEZELLEN³⁸⁾

	gemessen/errechnet aus	cal / ° Zelle
A 5.1.1	Wachstumswärme	-29 · 10 ⁻¹²
A 5.1.2	Verbrennungswärme	-14,5 · 10 ⁻¹²
A 5.1.3	Standardentr. + Wachstumswärme	-18,6 · 10 ⁻¹²
A 5.2.1	Photosynthese + Kondensation	- 7 · 10 ⁻¹²
A 5.2.2	auf statistischem Weg (Stand.entr.)	+ 5,3 · 10 ⁻¹² †)
A 5.2.3.1	Strukturentropie mit allem Wasser	- 8,6 · 10 ⁻¹²
	Strukturentropie mit gebund. Wasser	- 5,2 · 10 ⁻¹²
	Strukturentropie ohne Zellwasser	- 4,1 · 10 ⁻¹²
A 6	Zellinformation	-14,9 · 10 ⁻¹²

†) Standardentropien sind per definitionem positiv

Vergleicht man die beiden letzten Zeilen miteinander, bei denen jeweils das Zellwasser nicht in Rechnung gestellt wurde, so erkennt man den starken Einfluß der verschiedenen Bindungsmöglichkeiten der Atome an ihre Nachbarn auf den Entropiegehalt der Zelle.

38) MOROWITZ (1968, S. 97) erhält aus allgemeinen Abschätzungen einen Entropiewert von -2,5 cal/° g Biomasse, dem bei einem Zelltrockengewicht von 14,4 · 10⁻¹² g eine Entropie -3,6 · 10⁻¹² cal/° Zelle entsprechen würde.

LITERATURVERZEICHNIS

- BATTLE, E.H. Diss. 16(4) (1956) 629
BATTLE, E.H. Physiol. Plant. 13 (1960) 192, 628, 674
BAUER, E. Naturwissenschaften 8 (1920) 338
BAYNE-JONES, S. J. Bacteriol. 17 (1929) 105
BAYNE-JONES, S. J. Bacteriol. 17 (1929) 123
RHEES, H. S.
BELAICH, J.-P. C.R.Soc.Biol. 157 (1963) 316
BELAICH, J.-P. in: Les Développements Récents de la
SENEZ, J.C. Microcalorimétrie et de la Thermogenèse
- C.N.R.S., Paris 1967
BENZINGER, T.H. Fed. Proceed. 13 (1954) 11
KITZINGER, C. in: Temperature: Its Measurement and
Control in Science and Industry Vol. 3,
Part 3 - New York 1963
BISHOP, Ch. in: The Red Blood Cell - A Comprehensive
Treatise - New York 1964
BOIVINET, P. Perfectionnements aux méthodes d'éta-
lonnage et d'emploi du Microcalorimètre
E. CALVET - Utilisation en microbiologie
Thèses présentées à la Faculté des Sciences
de l'Université d' Aix-Marseille,
2 Octobre 1964
BROWN, H.D. Biochim.Biophys.Acta 94 (1965) 302
EVANS, W.J.
ALTSCHUL, A.M. J.Amer.Chem.Soc. 73,2 (1951) 2454
BUZELL, A. Microcalorimétrie - Applications physioco-
STURTEVANT, J.M. chimiques et Biologiques Paris 1956
CALVET, E. in: Experimental Thermochemistry, Vol. II
PRAT, H. - New York 1962
CALVET, E. J. Chim.Phys. 59 (1962) 319
CALVET, E. Recent Progress in Microcalorimetry
PRAT, H. Ed. and Transl. by H.A. SKINNER
Oxford 1963

-
- CALVET, E. J.Chim.Phys. 61 (1964) 303
 DUQUESNE, R.
- CANADY, W.J. Canad.J.Chem. 36 (1958) 1289
 LAIDLER, K.J.
- CLEAVER, J.E. Thymidine Metabolism and Cell Kinetics
 Amsterdam 1967
- COON, E.D. J.Phys.Chem. 37 (1933) 1
 DANIELS, F.
- CZERNIAWSKI, E. Bull.Acad.Pol.Sci.Cl.VI - Vol. XII,
 No.1 (1964)
- CZERNIAWSKI, E. Bull.Acad.Pol.Sci.Cl. II - Vol. XIII,
 SEDLACZEK, L. No. 5 (1965)
 ZABŁOCKI, B.
- EVANS, W.J. Anal. Biochem. 11 (1965) 449
 CARNEY, W.B.
- EYRING, H. Chem.Rev. 24 (1939) 253
 STEARN, A.E.
- FORREST, W.W. J. Bacteriol. 82 (1961) 685
 WALKER, D.J.
 HOPGOOD, M.F.
- GATLIN, L.L. J.Theoret.Biol. 18 (1968) 181
- GLASSTONE, S. The Theory of Rate Processes New York
 LAIDLER, K.L. 1941
 EYRING, H.
- GORSKI, F. Plant Growth and Entropy Production
 Zaklad Fizjologii Roslin Pan Krakow 1966
- GROOT, S.R. DE Thermodynamik irreversibler Prozesse
 Mannheim 1960
- HAASE, R. Naturwiss. 44 (1957) 409
- HEMPEL, S. Z.Naturforschg. 19b (1964) 929
 LASKOWSKI, W.
- HERMANS, J. Biochem. 4 (1965) 1277
 RIALDI, G.
- HILL, A.V. J. Physiol. 43 (1911) 261
- HILL, A.V. Nature 113 (1924) 859
- HOUBEN-WEYL Methoden der Organischen Chemie Bd.III
 Physikalische Methoden, Teil I
 Stuttgart 1955

-
- INGRAM, M. An Introduction to the Biology of Yeasts
- London 1955
- KARASZ, F.E. Contemp. Phys. 4 (1963) 321
- KITZINGER, C. in: Methods of Biochemical Analysis
BENZINGER, T.H. Vol. VIII - New York 1961
- KLEIBER, M. in: Biophysical Research Methods-New
York 1950
- KLEIBER, M. Der Energiehaushalt von Mensch und Haus-
tier - Ein Lehrbuch der Tierenergetik -
Hamburg 1967
- LANDOLT-BÖRNSTEIN Zahlenwerte und Funktionen aus Physik
Chemie Astronomie Geophysik und Tech-
nik II. Bd. Eigenschaften der Materie in
ihren Aggregatzuständen. 4. Teil: Kalo-
rische Zustandsgrößen - Berlin 1961
- LASKOWSKI, W. Z. Naturforschg. 15b (1960) 495
- LASKOWSKI, W. Z. Naturforschg. 17b (1962) 93
- LASKOWSKI, W. stud.biophys. 12 (1968) 167
- AVERBECK, D.
- LEHNINGER, A.L. Bioenergetics - New York 1965
- LEYDET, P. C.R.Acad.Sc.Paris 262 (1966) 48
- MEYERHOF, O. in: E.Abderhalden: Handbuch der Biologi-
schen Arbeitsmethoden, Abtlg. IV, Teil
10 - Berlin 1926
- MOLLIARD, M. C.R.Soc.Biol.87 (1922) 219
- MONOD, J. Recherches sur la Croissance des Cultures
Bactérienne - Paris 1942
- MOOR, H. Z.Zellforschg. 62 (1964) 546
- MOROWITZ, H.J. Bull.math.Biophys. 17 (1955) 81
- MOROWITZ, H.J. Energy Flow in Biology - New York 1968
- NETTER, H. Theoretische Biochemie - Physikalisch-
Chemische Grundlagen der Lebensvorgänge
Berlin 1959
- NIEL, C.B.VAN J.cell.comp.Physiol. 17 (1941) 49
- ANDERSON, E.H.
- OHLMEYER, P. Z. Naturforschg. 1 (1946) 30

-
- | | |
|--|--|
| OHLMEYER, P.
FRITZ, U. | Z. Naturforschg. <u>21b</u> (1966) 175 |
| PHILLIPSON, J. | Oikos <u>15</u> (1964) 130 |
| POHLIT, W.
LASKOWSKI, W.
LOCHMANN, E.-R. | Z. Naturforschg. <u>21b</u> (1966) 1089 |
| PRAT, H. | in: Les Développements Récents de la
Microcalorimétrie et de la Thermoge-
nèse - C.N.R.S., Paris 1967 |
| PRECHT, H.
CHRISTOPHERSEN, J.
HENSEL, H. | Temperatur und Leben - Berlin 1955 |
| PRIGOGINE, I.
WIAME, J.M. | Experientia <u>2</u> (1946) 451 |
| PRIGOGINE, I. | Introduction to the Thermodynamics
of Irreversible Processes
Springfield 1955 |
| PRUNIER, C.
COTEN, M. | J.Chim.Phys. <u>64</u> (1967) 1271 |
| REICHERT, U. | Gendosiswirkungen in einem tri- und
tetraploiden ad_2 -Mutantensystem von
Saccharomyces und deren molekular-
biologische Deutung
Diss.Math.-Naturw.Fak. Freie Univer-
sität Berlin 1969 |
| RIALDI, G.
HERMANS, J. | J.Amer.Chem.Soc. <u>88</u> (1966) 5719 |
| ROSE, A.H., ED. | Thermobiology - London 1967 |
| ROTH, W.A.
BECKER, F. | Kalorimetrische Methoden zur Bestim-
mung Chemischer Reaktionswärmen
Braunschweig 1956 |
| RUBNER, M. | Hygien.Rdsch. <u>13</u> (1903) 857 |
| RUBNER, M. | Arch.Hyg. <u>48</u> (1904) 260 |
| RUBNER, M. | Arch.Hyg. <u>49</u> (1904) 355 |
| RUBNER, M. | Arch.Hyg. <u>57</u> (1906) 193 |
| RUBNER, M. | in: Tigerstedt's Handbuch der Physiol.
Methodik Bd. 1 - Leipzig 1911 - 1914 |

-
- SCHMIDT, C.F.
BAYNE-JONES, S. J.cell.comp.Physiol. 3 (1933) 405
- SEDLACZEK, L.
CZERNIAWSKI, E.
ZABŁOCKI, B. Bull.Acad.Pol.Sci.Cl.II - Vol.XIII
No. 5 (1965)
- SEDLACZEK, L.
CZERNIAWSKI, E.
RADZIEJEWSKA, J.
ZABŁOCKI, B. Bull.Acad.Pol.Sci.Cl.II - Vol. XIV
No.9 (1966)
- SEIDEL, H.W. Bestimmung der spektralen Energieverteilung einer Röntgenhochleistungsrohre
Diplomarbeit am I.Physikalischen Institut
- Abtlg. Biophysik - der Freien Universität Berlin 1959
- SENEZ, J.
BELAICH, J.-P. in: Mécanismes de Régulation des Activités Cellulaires chez les Microorganismes - C.N.R.S., Paris 1965
- SIMONART, P.C.
LAUDELOUT, H. in: Les Développements Récents de la Microcalorimétrie et de la Thermogenèse - C.N.R.S., Paris 1967
- STEARNS, A.E.
EYRING, H. J.Chem.Phys. 5 (1937) 113
- STEIN, W. Naturwissenschaften 47 (1960) 374
- STEIN, W. Naturwissenschaften 47 (1960) 542
- STEINER, R.F.
KITZINGER, C. J.Biol.Chem. 222 (1956) 271
- STOWARD, P.J. Nature 194 (1962) 977
- SWIETOSLAWSKI, W. Roczn.Chem. 15 (1935) 343
- SWIETOSLAWSKI, W. Microcalorimetry - New York 1946
- TRINCHER, K.S. Biology and Information- Elements of Biological Thermodynamics - New York 1965
- WALISCH, W.
BECKER, F. Z.Physik.Chem.N.F. 36 (1963) 97
- WALISCH, W.
BECKER, F. Z.Physik.Chem.N.F. 46 (1965) 268, 279
- WHIPP, B. Phil.Mag.S. 7 18 (1934) 745

WHITE, W.P.

The Modern Calorimeter - New York 1928

WINZLER, R.J.

J.cell.comp.Physiol. 12 (1938) 183

BAUMBERGER, J.P.

ZABŁOCKI, B.

in: Les Développements Récents de la
Microcalorimétrie et de la Thermogenèse
- C.N.R.S., Paris 1967

SEDŁACZEK, L.

CZERNIAWSKI, E.

-

Die Hefen - Bd. 1 Die Hefen in der Wis-
senschaft - Nürnberg 1960

-

The Red Blood Cell - A Comprehensive
Treatise; Ed. C. BISHOP - D.M.
SURGENOR New York 1964

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin. Seinem Direktor, Herrn Prof. Dr. W. Stein, bin ich für Thema, ständige Unterstützung und zahlreiche fördernde Gespräche sehr verbunden.

Ohne die Deutsche Forschungsgemeinschaft, die Mikrokalorimeter und kostspielige Zusatzeinrichtungen zur Verfügung gestellt hat, wären diese Untersuchungen nicht durchführbar gewesen. Hier Dank zu sagen, ist angenehme Pflicht.

Viele Mitglieder des Institutes haben in Diskussionen, mit Anregungen und durch Bereitstellen biologischen Materials den Fortgang der Experimente wesentlich gefördert. Stellvertretend für alle sei den Herren D. Averbek, Prof. Dr. W. Laskowski, Priv.-Doz. Dr. E.-R. Lochmann und Dr. U. Reichert vielmals gedankt. In diesen Dank ist Herr G. Bjeske eingeschlossen, bei dem der Umbau des Kalorimeterraumes, die Anfertigung verschiedener Kalorimeterzusätze und die Betreuung der Geräte in guten Händen lag.

Ein ganz besonders herzlicher Dank aber gilt Frau Carola Meggers, die durch ihre aufmerksame und gewissenhafte Assistenz viele Versuche möglich gemacht und in ihrem interessierten Mitdenken ein Beispiel bester Zusammenarbeit gegeben hat.

Herr Prof. Dr. W. Pohlitz/Frankfurt hat liebenswürdigerweise die Erstellung des Zweitgutachtens übernommen und eine Reihe wertvoller Hinweise gegeben, die ich gern in dieser Arbeit nachträglich berücksichtigt habe.

LEBENS LAUF

Am 27. November 1933 wurde ich als Sohn des Professors Dr. Wilhelm Lamprecht und seiner Frau Edith, geb. Stephan, in Dortmund geboren. Im Frühjahr 1934 siedelten wir nach Frankfurt/Oder um.

Ab Ostern 1940 besuchte ich dort die Grundschule und im Herbst 1944 für einige Monate das Friedrich-Gymnasium. Nach der Flucht im Frühjahr 1945 konnte ich nach einem Sommer in einer einklassigen Dorfschule vom Winter 1945 ab in die Oberschule zu Osterode/Harz gehen. Ostern 1948 trat ich in die Oberschule in Delmenhorst/Oldenburg ein, an der ich 1954 mein Abitur bestand.

Für die ersten 3 Semester meines Physik- und Mathematik-Studiums ging ich an die Universität Innsbruck, im Anschluß dann an die Universität Münster. Zum Wintersemester 1958/59 wechselte ich an die Freie Universität Berlin über und machte dort im Dezember 1960 mein Philosophikum, 2 Jahre später das Staatsexamen für das Amt des Studienrates in den Fächern Physik und Mathematik.

Vom 1.6. bis zum 30.11.1964 war ich Assistent am Studentendorf der Freien Universität, ab 1.1.1966 Wissenschaftlicher Hilfsassistent und ab 1.1.1967 Wissenschaftlicher Assistent m.d.W.b. am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin.

